

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 733 515

(21) N° d'enregistrement national :

95 05053

(51) Int Cl^e : C 12 Q 1/68

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 27.04.95.

(71) Demandeur(s) : CIS BIO INTERNATIONAL SOCIETE
ANONYME — FR et TEOULE ROBERT — FR.

(30) Priorité :

(72) Inventeur(s) : FOUCHE BRIGITTE et TEOULE
ROBERT.

(43) Date de la mise à disposition du public de la
demande : 31.10.96 Bulletin 96/44.

(73) Titulaire(s) :

(56) Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : Se reporter à la fin du
présent fascicule.

(74) Mandataire : CABINET ORES.

(54) TAMpon, PROCEDE ET METHODE D'EVALUATION DES CONDITIONS OPTIMALES, D'AMPLIFICATION DE
SEQUENCES CIBLES D'ACIDE NUCLEIQUE, ET LEURS APPLICATIONS.

(57) Tampon d'amplification, facilitant la dénaturation des
acides nucléiques, tout en préservant la structure des
enzymes mises en oeuvre et améliorant significativement les
performances de la réaction d'amplification en chaîne, et
ses applications, notamment dans un procédé d'amplification
de séquences cibles d'acide nucléique mettant en oeuvre
plusieurs températures et dans une méthode d'évaluation
des conditions optimales à mettre en oeuvre dans ledit
procédé d'amplification.

Ledit tampon comprend, outre les constituants d'un tampon d'amplification standard, au moins un agent iso-déstabilisant (AI), éventuellement associé à au moins un agent
dénaturant (AD), présents à des concentrations aptes à réduire la température de fusion Tm de la séquence cible
d'acide nucléique double-brin d'au moins une quantité
 ΔTm_{AI} , conformément à la formule 1:

$$\Delta Tm_{AI} = f [(\% G+C), (\text{molarité de AI})]$$

pour diminuer au moins la température de dénaturation
Td de ladite séquence cible d'acide nucléique double-brin,
et ce tout en permettant un bon fonctionnement de la réaction
enzymatique d'elongation des amores.

FR 2 733 515 - A1

BEST AVAILABLE COPY



La présente invention est relative à un tampon d'amplification, facilitant la dénaturation des acides nucléiques, tout en préservant la structure des enzymes mises en oeuvre et améliorant significativement les performances de la réaction d'amplification en chaîne, ainsi que ses applications, notamment dans un procédé d'amplification de séquences cibles d'acide nucléique mettant en oeuvre plusieurs températures et dans une méthode d'évaluation des conditions optimales à mettre en oeuvre dans ledit procédé d'amplification.

Plusieurs méthodes d'amplification de séquences d'acides nucléiques ont été décrites ; ces différentes méthodes comprennent de manière générale une étape de dénaturation de la séquence d'acide nucléique double-brin, une étape d'hybridation d'amorces et une étape d'elongation desdites amorces en présence d'une enzyme d'elongation (polymérase (PCR), ligase (LCR), OCR).

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR), telle que décrite, notamment par SAIKI R. et al. (Science, 20 1985, 230, 1350 ; Brevets européens CETUS 201 184 et 258 017), permet d'amplifier des séquences d'acide nucléique double-brin (ou duplex). Elle est basée sur le fonctionnement cyclique d'une ADN polymérase, capable de copier un brin d'ADN, utilisé comme matrice, en un brin complémentaire, par elongation à partir de l'extrémité 3' OH libre d'une amorce oligonucléotidique.

La technique PCR consiste à effectuer n cycles successifs d'amplification, au cours desquels deux amorces dirigent l'amplification de la séquence d'ADN double-brin qu'elles encadrent.

Un cycle d'amplification PCR comporte essentiellement 3 étapes distinctes :

- une étape de dénaturation du double-brin d'ADN à amplifier, par chauffage à une température Td,

une étape d'hybridation des amorces oligonucléotidiques, à une température Th, généralement comprise entre 37°C et 60°C, avec chacun des simples-brins d'ADN ; la longueur des amorces utilisées pour amplifier un fragment d'ADN est généralement comprise entre 18 et 30 nucléotides, et

une étape d'elongation de l'amorce par copie enzymatique de chaque simple-brin d'ADN, qui joue le rôle de matrice, par une ADN polymérase, à une température Te, généralement comprise entre 60°C et 75°C ; dans ces conditions, chaque simple-brin d'ADN donne naissance à un double-brin d'ADN. Lorsque cette étape est effectuée avec la Taq ADN polymérase, elle est généralement réalisée à 72°C.

Une réaction PCR "standard" est effectuée dans un volume de 50 ou 100 µl et outre l'échantillon d'ADN à amplifier, contient un tampon d'amplification incluant : KCl 25-50 mM, Tris-HCl 10-20 mM (pH 8,4, à température ambiante), MgCl₂ 1,5 mM, gélantine 100 µg/ml, 10-100 pmoles de chaque amorce, chacun des 4 désoxynucléotide triphosphates (dNTPs) à une concentration comprise entre 125 et 200 µM et 2,5 unités de Taq ADN polymérase. Quelques gouttes d'huile sont généralement ajoutées, de manière à éviter notamment l'évaporation du tampon. Les cycles sont généralement effectués comme suit :

25

Cycle	Dénaturation	Hybridation	Elongation
1er cycle	5 min. à 94°C	2 min. à 50 - 55°C	3 min à 72°C
cycles suivants	20 sec. à 1 min. à 94°C	20 sec. à 55°C ou 2 min. à 50°C	30 sec. à 3 min. à 72°C.
dernier cycle	1 min. à 94°C	2 min. à 50°C	10 min. à 72°C

La PCR permet alors l'utilisation, dans des conditions adéquates, de toutes les séquences néosynthétisées au cycle n , comme matrices pour l'ADN polymérase au cycle $n+1$. Il en résulte une amplification exponentielle du nombre de séquences d'acides nucléiques cibles, en fonction du nombre de cycles ; au cours de cette amplification, la quantité de séquences cibles obtenues peut être reliée à la quantité Q_0 de séquences cibles initiales, au facteur d'amplification x et au nombre de cycles n , par la formule

10 $Q = Q_0 (1+x)^n.$

La PCR permet ainsi d'amplifier, de manière exponentielle, des séquences d'acides nucléiques dites cibles, des milliers de fois.

Malgré l'intérêt que représente cette technique
15 et les nombreuses applications auxquelles elle a donné lieu, elle est limitée à la fois :

- dans son rendement en ADN produit (de l'ordre de quelques dizaines de $\mu\text{g/ml}$),
20 parasites d'amplification)

- dans sa spécificité (formations de bandes
effectivement amplifié et
- dans la difficulté, voire l'impossibilité à
amplifier des segments d'ADN riches en paires de bases G+C.

25 Ce sont en particulier les températures très élevées, au voisinage de l'ébullition, que nécessite la PCR pour la dénaturation des double-brins d'ADN, qui entraînent, en partie, ces limitations ; il en résulte un certain nombre d'inconvénients, qui continuent à mettre un frein à son utilisation effective en routine tant dans le domaine de la production de séquences que dans le domaine du diagnostic.

30 Les inconvénients liés aux températures à sélectionner, au cours de chaque étape de la PCR peuvent être résumés comme suit :

a) inconvénients liés à la température de dénaturation (Td) :

- dans les cas où les températures utilisées pour la dénaturation (Td : 95°C pendant 30 sec ou 97°C pendant 15 sec, par exemple) ne sont pas suffisantes (séquences cibles riches en G+C), elles conduisent à une dénaturation incomplète des double-brins d'ADN ;
- des étapes de dénaturation qui sont effectuées à des températures plus élevées (de l'ordre de 98°C) et/ou qui sont trop longues, conduisent à une perte d'activité de l'ADN polymérase ; en effet, la demi-vie de la Taq ADN polymérase, l'enzyme couramment employée, est respectivement de > 2 h, 40 min et 5 min pour 92,5°C, 95°C et 97°C (SAIKI R.K., *PCR Technology. Principles and applications for DNA amplification*, éd. H.A. Erlich Stockton Press, 1989). Bien que des enzymes plus thermostables aient été proposées pour remplacer la Taq ADN polymérase, l'inconvénient de l'utilisation de hautes températures de dénaturation demeure ;
- l'utilisation de températures très élevées et de temps de dénaturation initiaux allant de 1 à 7 min à pH 7,0-8,0 est incompatible avec une bonne conservation de la matrice d'ADN et des dégradations importantes du biopolymère sont observées, qui empêchent l'amplification de très longues chaînes d'ADN (C.E. GUSTAFSON et al., Gene, 1993, 123, 241-244) ;
- la température très élevée qui est utilisée au cours de la dénaturation des duplex (94-97°C), peut entraîner l'évaporation du milieu réactionnel ; pour l'éviter une couche d'huile est ajoutée, à l'intérieur de chaque tube réactionnel. Toutefois, la présence de cette huile peut présenter des inconvénients (inhibition de réaction, pollution des produits formés, etc...).

- la température de fusion (T_m), température à laquelle 50 % de l'acide nucléique est sous la forme simple-brin, croît avec la concentration en duplex, conformément au calcul théorique de l'hybridation des duplex d'acides nucléiques par la méthode thermodynamique de BRESLAUER et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1986, 83, 3746-3750) ; il existe donc une limitation théorique à l'hybridation, due à la quantité de duplex formés, quelles que soient les quantités d'enzyme ou de nucléosides triphosphates présents dans le tampon d'amplification. En conséquence, comme précisé ci-dessus, la quantité d'ADN produite est limitée à quelques dizaines de $\mu\text{g}/\text{ml}$.

- les molécules qui ne sont pas thermostables ne peuvent pas être incorporées dans les amorces d'amplification ; or, pour différentes raisons (fixation sur des supports, marqueurs de détection), il peut être intéressant de travailler à plus basses températures (fixation de biopolymères, de molécules thermosensibles pour la fixation ou la détection, etc...).

20 b) inconvénients liés à la température d'hybridation (Th) :

- l'autoappariement de fragments d'un même brin est source de mauvais appariements entre les amorces et la matrice et d'arrêts de copie, ce qui conduit en particulier à la présence de structures secondaires et à l'obtention de plusieurs bandes, après électrophorèse, alors que si l'amplification est spécifique, un seul produit constitué d'ADN double-brin de la longueur désirée doit être produit et en conséquence, une seule bande doit être observée en électrophorèse.

c) en ce qui concerne l'ensemble des températures mises en oeuvres (Td, Th et Te) :

- la plupart des thermocycleurs commerciaux n'assurent pas une homogénéité de température dans les

différents puits. Cela affecte la reproductibilité de l'amplification et c'est une des raisons pour lesquelles il est difficile de faire des mesures quantitatives avec la PCR.

Des températures maximales moins élevées et des variations extrêmes plus faibles atténuerait ce problème. Cela permettrait d'utiliser cette technique PCR *in situ* (intérêt d'utiliser des amplifications avec moins d'écart de température et une température maximale plus faible sur des coupes cellulaires).

10 Pour augmenter le rendement et/ou la spécificité de la PCR et/ou la longueur des séquences amplifiées, plusieurs solutions ont été proposées :

- la technique du *hot start* : si le mélange de l'ensemble des réactifs de la PCR est effectué à froid, 15 l'hybridation des oligonucléotides est peu spécifique et des copies sont initialisées à des positions incorrectes. En effectuant le mélange à température élevée, supérieure à celle de l'hybridation, la réaction d'amplification démarre plus correctement. L'inconvénient pratique est évident : la 20 manipulation des tubes à température élevée est peu commode et toute maladresse est source de contamination.

- la mise en oeuvre de l'étape d'hybridation et de l'étape d'elongation des amorces à une même température, supérieure à 55°C (KIM H.S. et al., 1988, Nucl. Acids Res., 25 16, 8887-8903).

- l'addition de certains dénaturants ou de co-solvants au mélange réactionnel PCR.

Un article récent, paru dans Gene (VARADARAJ K. et al. (1994, 140, 1-5), fait le point sur l'usage de certains dénaturants ou de cosolvants qui permettent d'améliorer le rendement et la spécificité de la PCR et dans certains cas, de la rendre possible (BOOKSTEIN R. et al., Nucleic Acids Res., 1990, 18, 1666 ; CHESTER N. et al., Anal. Biochem., 1993, 209, 284-290 ; DUTTON C.M. et al.,

Nucleic Acids Res., 1993, 21, 2953-2954 ; HUNG T. et al., Nucleic Acids Res., 1990, 18, 4953 ; LU Y.H. et al., Trends Genet, 1993, 9, sept, 297 ; SARKAR G. et al., Nucleic Acids Res., 1990, 18, 7465). On peut citer le DMSO (diméthyl sulfoxyde), le TMACl (chlorure de triméthyl ammonium), le glycérol, le formamide, des détergents, tels que le Tween 20 et le NP-40.

Ces articles montrent que :

- a) les résultats obtenus par ces différents Auteurs sont contradictoires. Suivant les Auteurs, le même produit est décrit comme étant efficace ou inhibiteur. Par exemple, BOOKSTEIN R. et al. (1990, précité) décrivent l'amélioration de la PCR pour un fragment génique par addition de DMSO à 10 % ; INNIS M.A. et al. (*PCR protocols. A guide to methods and applications*, Academic Press, Inc, 1990) et SAIKI R.K. (1989, précité) décrivent l'effet néfaste du DMSO à 10 % sur le rendement et l'efficacité de la PCR ; SARKAR G. et al. (1990, précité) décrivent l'inefficacité du DMSO et proposent le formamide. VARADARAJ K. et al. (1994, précité) précisent que des concentrations supérieures à 5 % de DMSO inhibent la PCR.

Ces différents travaux ont été réalisés avec la Taq ADN polymérase et les effets divers obtenus sont dus, selon certains Auteurs au fait que ces agents dénaturants de l'ADN diminuent considérablement l'activité des ADN polymérasées, alors que d'autres considèrent qu'ils facilitent la copie de la matrice. Toutefois aucune procédure formalisée et reproductible n'est décrite.

- b) les mécanismes spécifiques responsables de l'accroissement de l'amplification de l'ADN par des détergents, des chaotropiques ou des cosolvants ne sont ni connus (VARADARAJ K. et al., 1994, précité, page 4), ni formalisés, ni reproductibles.

Des articles très récents (W. BARNES, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994, 91, 2216-2220 ; S. CHENG et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, juin 1994, 5695-5699) décrivent l'amplification de très longues chaînes d'ADN (42 kb) qui 5 ont été obtenues à partir du phage λ (contenu en G+C = 49 %). Les Auteurs utilisent différentes améliorations dont beaucoup ont été décrites antérieurement (voir références ci-dessus) :

- temps de dénaturation très précis et très courts : 5 s à 94°C, qui nécessite un thermocycleur spécial et une technologie difficile à maîtriser en routine,
- technique du « hot-start »,
- temps d'extension compris entre 10 et 22 min,
- addition au tampon d'amplification, de DMSO et 15 de glycérol,
- utilisation de deux ADN polymérasases thermostables, l'une ayant une activité 3'-5'-exonucléasique dans le tampon d'amplification,
- augmentation du pH.

20 Des pointes de température au delà de 94°C pour résoudre le problème des zones riches en G+C n'ont pas apporté le bénéfice espéré (CHENG et al., 1994, précité). Toutefois, ces modifications ne permettent pas d'obtenir une méthode reproductible (BARNES, 1994, précité).

25 Toutefois dans ces travaux récents (CHENG et al., 1994, BARNES, 1994), comme dans ceux décrits antérieurement et concernant des fragments plus grands que 800 nucléotides, la réaction de dénaturation du cycle PCR s'effectue, en fait au minimum à la température $T_d=94^{\circ}\text{C}$.
30 Aucune étude chiffrée précise et systématique n'est donnée pour analyser les résultats et orienter de façon corrélée le choix des températures de dénaturation T_d et d'hybridation T_h , en fonction de la concentration en additifs.

En conséquence, la Demandante s'est donné pour but de pourvoir à un tampon d'amplification et à un procédé d'amplification de séquences cibles d'acide nucléique, qui limitent les inconvénients spécifiés ci-dessus, notamment en 5 ce que :

- l'étape de dénaturation des duplex d'ADN puisse s'effectuer à une température T_d inférieure à celle qui est couramment utilisée (94°C) pour la PCR,

10 - la dénaturation des duplex d'ADN initiaux ou obtenus par l'ADN polymérase puisse s'effectuer complètement, quelle que soit leur longueur ou leur contenu naturel en (G+C), sans dommage sérieux pour la stabilité de l'ADN polymérase et/ou l'intégrité de la matrice d'ADN, et
- le procédé soit facilement reproductible.

15 C'est également un but de l'invention de fournir une méthode d'évaluation des conditions optimales à mettre en oeuvre dans un procédé d'amplification conforme à l'invention, pour obtenir aisément des produits d'amplification longs et/ou à forte teneur en (G+C). La production 20 de ces fragments d'ADN ouvre en particulier de multiples applications, tant dans le domaine de la recherche génétique et du séquençage du génome que dans le domaine du diagnostic et de la thérapeutique.

La présente invention a pour objet un tampon, 25 apte à être mis en oeuvre dans un procédé d'amplification d'au moins une séquence cible d'acide nucléique, du type comprenant n cycles, chacun desdits cycles incluant une étape de dénaturation de la séquence cible double-brin, réalisée à une température de dénaturation T_d , une étape d'hybridation entre la séquence cible simple-brin et au moins 30 une amorce appropriée, réalisée à une température d'hybridation T_h et une étape d'elongation de l'amorce ayant hybridé, en présence d'une enzyme d'elongation d'acide nucléique et à une température d'elongation T_e , lequel tam-

pon est caractérisé en ce qu'il comprend, outre les constituants d'un tampon d'amplification standard, au moins un agent isodéstabilisant (AI), éventuellement associé à au moins un agent dénaturant (AD), présents à des concentrations aptes à réduire la température de fusion T_m de la séquence cible d'acide nucléique double-brin d'au moins une quantité $\Delta T_{m_{AI}}$, conformément à la formule 1 :

$$\Delta T_{m_{AI}} = f[(\% \text{ G+C}), (\text{molarité de AI})],$$

pour diminuer au moins la température de dénaturation T_d de 10 ladite séquence cible d'acide nucléique double-brin, et ce tout en permettant un bon fonctionnement de la réaction enzymatique d'elongation des amorces.

En effet, de manière inattendue, une telle diminution de la température de fusion T_m permet de réduire au 15 moins la température maximale du cycle d'amplification T_d (ou température de dénaturation) et de préférence, à la fois la température maximale du cycle d'amplification T_d et la température minimale du cycle d'amplification T_h (ou température d'hybridation).

Conformément à l'invention, ledit tampon est avantageusement mis en oeuvre, et ce de manière non limitative :

- soit dans un procédé d'amplification en chaîne par polymérase,
- soit dans un procédé d'amplification en chaîne par ligase,
- soit dans un procédé d'amplification en chaîne par ligase avec réparation.

Au sens de l'invention et dans le cas de la PCR, 30 on entend par tampon d'amplification standard, par exemple : Tris-HCl 10 mM, pH 8,5, KCl 50 mM, MgCl₂, 1,5-2,5 mM, mélange des 4 désoxynucléotides, amorces et Taq ADN polymérase, à différentes concentrations, selon les cas.

Conformément à l'invention, ledit agent isodéstabilisant (AI) est une substance dont la caractéristique principale est de diminuer l'influence stabilisatrice apparente des paires de bases (G+C) sur le Tm des acides nucléiques.

Egalement conformément à l'invention, un agent dénaturant (AD) est une substance qui diminue la température de fusion d'un fragment d'ADN de façon proportionnelle à son pourcentage en solution, à peu près indépendamment de la nature des bases qui le composent.

La température de fusion d'un duplex d'ADN de grande longueur (c'est-à-dire supérieure à 1kb) est calculée de façon approximative par la formule empirique suivante :

$$Tm\ (^{\circ}C)=81,5+0,41(\% G+C)-675/N+16,6.\log M-\Delta Tm_{AD} \text{ (formule 2)}$$

dans laquelle :

$$\Delta Tm_{AD}=d(\% \text{ agent dénaturant}) \text{ (formule 3)}$$

M : molarité du/des cations monovalents présents dans le tampon (généralement Na et/ou K),

N : nombre de nucléotides,

d : coefficient d'efficacité de l'agent dénaturant (AD), généralement compris entre 0,25 et 0,7.

Conformément à l'invention, ledit tampon d'amplification comprenant au moins un agent isodéstabilisant (AI) et éventuellement au moins un agent dénaturant, diminue la température de fusion Tm de la séquence cible d'acide nucléique double-brin selon la formule 4 suivante :

$$Tm\ (^{\circ}C)=81,5+0,41(\% G+C)-\Delta Tm_{AI}-675/N+16,6.\log M-\Delta Tm_{AD} \text{ (formule 4)},$$

qui rend compte de la diminution de Tm provoquée par l'agent isodéstabilisant ΔTm_{AI} (formule 1) et éventuellement par l'agent dénaturant ΔTm_{AD} (formule 3).

Le Tm est une donnée moyenne. La fusion d'un grand segment d'ADN se produit localement par zones de quel-

ques dizaines à quelques centaines de paires de bases, comme on peut l'observer au microscope électronique. Les zones qui restent hybridées sont les zones qui sont riches en paires de bases G+C. Celles où les simples brins sont séparés sont riches en A+T. Les courbes classiques d'hyperchroïsme ne permettent pas de déceler si 1 % d'ADN reste hybridé, c'est-à-dire si les deux molécules d'ADN simple brin restent rattachées physiquement par une petite fraction de bases encore hybridées. L'agent isodéstabilisant diminue la valeur du T_m d'une quantité $\Delta T_{m_{AI}}$ et, par conséquent, la valeur apparente du coefficient 0,41 qui entre dans l'expression du T_m . Mais ce qui est le plus important, c'est la très grande efficacité de l'agent isodéstabilisant à jouer sur les zones à très forte teneur en G+C pour obtenir la séparation ultime et complète de deux molécules d'ADN simple brin des duplex d'amplification, au cours de leur dénaturation, à la température maximale du cycle d'amplification PCR, par exemple.

De manière inattendue, dans le cas de l'amplification en chaîne par polymérase, par exemple, le tampon d'amplification conforme à l'invention :

a) facilite spécifiquement la dénaturation des zones riches en G+C, grâce à l'agent isodéstabilisant, permet l'amplification de fragments longs et/ou à haute teneur en G+C, qu'il serait impossible d'amplifier ou d'amplifier aussi efficacement, dans les tampons conventionnels, avec ou sans agent dénaturant.

Si la dénaturation des duplex d'amplification, par chauffage à la température maximale du cycle PCR est imparfaite, c'est-à-dire si les simples chaînes produites demeurent rattachées par une petite fraction de paires de bases à haute teneur en G+C, la refermeture du duplex au cours du refroidissement nécessaire pour l'hybridation des amorces se produira en quelques secondes, voire quelques fractions de secondes (figure 1). Dans ce cas, l'hybridation

des amorces sera infime parce qu'elles seront rejetées par la fermeture du duplex avant d'avoir été suffisamment allongées et ainsi stabilisées par l'ADN polymérase. Si des simples brins d'ADN de grande longueur sont physiquement 5 bien séparés, la nucléation initiale, c'est-à-dire la reconnaissance correcte et l'hybridation d'une petite partie de la séquence entre les deux simples chaînes est l'étape limitante qui gouverne leur hybridation et elle exige plusieurs minutes. La concentration molaire des amorces étant 10 des milliers, voire des millions de fois plus élevée que celle des simples brins de la matrice d'amplification, la probabilité de reconnaissance entre les amorces et la matrice simple brin est très élevée et la réaction PCR est très efficace.

15 b) facilite aussi de façon non spécifique, c'est-à-dire indépendamment de la nature des bases, la dénaturation des duplex d'ADN, grâce aux agents dénaturants et permet par la synergie des effets spécifique et non spécifique d'abaisser fortement les températures maximales et 20 minimales Td et Th du cycle PCR,

c) permet parfois d'améliorer la spécificité d'amplification en diminuant ou même en éliminant les bandes parasites,

d) permet d'atteindre des rendements finals 25 d'amplification volumique plus élevés, puisque la température de dénaturation des duplex augmente avec leur concentration,

e) permet d'améliorer la reproductibilité et la fiabilité de la PCR, en augmentant la plage de température 30 pour la dénaturation des duplex, puisque la diminution de la température limite est considérable (dans une expérience type, elle diminue d'environ 10°C : de 92,5°C à 82°C).

Selon un mode de réalisation avantageux dudit tampon, l'agent isodestabilisant est sélectionné dans le

groupe constitué par les halogénures d'alkylammonium et les ions dipolaires (zwitterions).

Le zwitterion est, de préférence la N,N,N triméthylglycine ; le groupement alkyle est de préférence au moins en C₂.

Selon un autre mode de réalisation avantageux dudit tampon, l'agent dénaturant est sélectionné dans le groupe constitué par le diméthylsulfoxyde (DMSO), le glycérol, le formamide, le diméthylformamide (DMF), les uréides, les polyols et les détergents.

Selon un autre mode de réalisation avantageux dudit tampon d'amplification, il comprend un mélange d'un agent isodéstabilisant et d'un agent dénaturant.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation ledit mélange est constitué de N,N,N triméthylglycine et de DMSO.

Selon une disposition préférée de ce mode de réalisation, la concentration en N,N,N triméthylglycine est comprise entre 0,05 et 4 M, de préférence entre 1 et 2,5 M, et la concentration en DMSO est comprise entre 0,5 et 15 %, de préférence entre 5 et 10 %.

De préférence, la concentration en N,N,N triméthylglycine est de 1,5 M et la concentration en DMSO est de 5 à 10 %.

Pour la plupart des fragments d'ADN analysés, la diminution de T_{dmin} est supérieure à 10°C pour du DMSO à 10 %, additionné à la N,N,N triméthylglycine 1,5 M.

Selon un autre mode de réalisation avantageux dudit tampon, il comprend un mélange d'un agent isodéstabilisant et de deux agents dénaturants.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation, ledit tampon comprend un mélange constitué de N,N,N triméthylglycine, de DMSO et de glycérol.

Selon une modalité préférée de cette disposition, la concentration en N,N,N triméthylglycine est comprise entre 0,05 et 4 M, de préférence entre 1 et 2,5 M, la concentration en DMSO est comprise entre 0,5 et 15 %, de 5 préférence entre 5 et 10 % et la concentration en glycérol est comprise entre 1 et 30 %, de préférence entre 3 et 20 %.

Le tampon conforme à l'invention, très efficace pour la dénaturation des séquences riches en (G+C), peut avantageusement être mis en oeuvre dans un procédé 10 d'amplification en chaîne d'au moins une séquence cible d'acide nucléique.

Ledit tampon peut notamment être mis en oeuvre dans un procédé d'amplification en chaîne par polymérase (PCR), comprenant n cycles, chacun desdits cycles incluant 15 une étape de dénaturation de la séquence cible double-brin, réalisée à une température de dénaturation Td, une étape d'hybridation entre la séquence cible simple-brin et au moins une amorce appropriée, réalisée à une température d'hybridation Th et une étape d'elongation de l'amorce 20 hybridée, en présence d'au moins une ADN polymérase et à une température d'elongation Te.

Selon un mode de mise en oeuvre avantageux de ce procédé d'amplification PCR, chaque cycle est effectué avec deux températures Td (température de dénaturation) et Th 25 (température d'hybridation) = Te (température d'elongation), ledit procédé étant, de préférence, mis en oeuvre en présence d'amorces comprenant plus de 30 nucléotides, et dont la température de fusion Tm est élevée.

De manière inattendue, un tel mode de mise en 30 oeuvre du procédé conforme à l'invention, présente une sélection de conditions (amorces de plus de 30 mers et tampon d'amplification contenant au moins un agent isodéstabilisant et éventuellement un agent dénaturant) qui, en synergie, coopèrent pour, simultanément :

- réduire l'écart des températures Td-Th en utilisant des oligonucléotides de grande taille comme amores, et
- diminuer les températures Td et Th, du fait de la réduction des Tm d'au moins une quantité $\Delta T_{m_{AI}}$.

En effet, l'utilisation d'amores longues (plus de 30 mères) permet de réaliser l'elongation en présence d'une enzyme thermostable, à la température d'hybridation des amores ($Th=Te$) ; elles présentent aussi l'avantage d'être plus spécifiques que les sondes courtes de 20 mères.

Ledit tampon peut également être mis en oeuvre dans un procédé d'amplification en chaîne par ligase (LCR) ou par ligase avec réparation.

La présente invention a également pour objet une méthode d'évaluation des conditions optimales à mettre en oeuvre dans un procédé d'amplification tel que défini ci-dessus, caractérisée en ce qu'elle comprend le tracé du diagramme des températures définissant les domaines de Td et Th (température maximale et minimale de l'amplification, PCR notamment), conformément aux étapes suivantes :

- (1) la réalisation :
 - de la courbe des températures minimales de dénaturation (Td_{min}) des duplex d'acide nucléique cible, du type $Td_{min_n} = Td_0 - by_n$, dans laquelle Td_{min_n} représente la valeur de la température minimale de dénaturation pour une concentration y_n en agent isodestabilisant, Td_0 représente la valeur de la température minimale de dénaturation en l'absence d'additif (agent déstabilisant ou agent dénaturant) et b représente la pente de la droite et
 - de la courbe des températures maximales d'hybridation des amores (Th_{max_n}), en fonction de la concentration y_n en agent isodestabilisant et en l'absence

d'agent dénaturant (figure 2, application de la méthode à la PCR) ;

De façon inattendue, l'expérience montre que T_{dmin} et Th_{max} sont des droites, dans la limite des erreurs expérimentales et de la précision nécessaire, dans la zone utile de concentrations.

(2) la sélection d'au moins une concentration y_n en agent isodéstabilisant, pour laquelle la température de dénaturation T_d et la température d'hybridation Th satisfont aux conditions suivantes : $T_d > T_{dmin_n} > Th_{max_n} > Th$ (figure 3, application de la méthode à la PCR),

(3) la réalisation :

- de la courbe des températures minimales de dénaturation (T_{dmin}) des duplex d'acide nucléique cible, du type $T_{dmin_i} = T_{d_0} - ax_i$, dans laquelle T_{dmin_i} représente la valeur de la température minimale de dénaturation pour une concentration x_i en agent dénaturant et pour la concentration y_n choisie en agent isodéstabilisant à l'étape (2), T_{d_0} représente la valeur de la température minimale de dénaturation en l'absence d'additif (agent déstabilisant ou agent dénaturant) et a représente la pente de la droite et

- de la courbe des températures maximales d'hybridation des amorces (Th_{max_i}), en fonction de la concentration en agent dénaturant x_i et pour la concentration y_n sélectionnée à l'étape (2) en agent isodéstabilisant (figure 2) ;

De façon inattendue, l'expérience montre que T_{dmin} et Th_{max} sont des droites, dans la limite des erreurs expérimentales et de la précision nécessaire, dans la zone utile de concentrations.

(4) la sélection d'au moins une concentration en agent dénaturant, pour laquelle T_d et T_h satisfont également aux conditions suivantes : $T_d > T_{dmin} > T_{hmax} > T_h$ (figure 3) et

5 (5) la préparation d'un tampon d'amplification conforme à l'invention, dans lequel l'agent isodéstabilisant et l'agent dénaturant sont aux concentrations sélectionnées aux étapes (2) et (4) ci-dessus.

10 Selon un mode de mise en oeuvre avantageux de ladite méthode d'évaluation, lorsque les amorces sont courtes et de point de fusion faible, une étape d'elongation intermédiaire des amorces à une température T_e est mise en oeuvre, avec $T_d > T_e > T_h$ et avec T_e , le plus près possible de la température optimale de fonctionnement de l'enzyme d'elongation (ADN polymérase, ligase...).

15 Dans les figures 2 et 3 et le texte qui suit, ladite méthode d'évaluation est illustrée pour la PCR et pour une gamme de concentrations x en agent dénaturant, mais la méthode est la même pour des variations de concentration x en agent isodéstabilisant comme le montre la figure 4.

20 Il faut noter que trois expériences PCR avec chacune une gamme de concentrations x sont généralement suffisantes pour définir T_{dmin} .

25 L'amplification est effectuée à deux températures ($T_h = T_e$ et T_d), dans un tampon standard, contenant éventuellement d'autres additifs, sur une série d'échantillons comportant des concentrations croissantes x en agent dénaturant (ou agent isodéstabilisant, voir également concentrations y_n telles que définies ci-dessus). De façon inattendue, on observe que la réaction d'amplification ne se 30 produit que pour des concentrations comprises entre une valeur minimale (x_1) et une valeur maximale (x_2). On propose l'interprétation suivante illustrée par les figures 2 et 3.

L'addition d'agent dénaturant permet d'agir sur deux paramètres essentiels de l'amplification :

a) la courbe de fusion des duplex de la cible biologique, formés par les copies réalisées avec l'ADN polymérase (pourcentage d'ADN simple-brin en fonction de la température) (figure 2).

L'addition d'agent dénaturant au tampon d'amplification PCR permet d'obtenir une dénaturation convenable des duplex de la cible à une température inférieure à celle qui est nécessaire avec un tampon ordinaire. Il faut que la concentration d'agent dénaturant et/ou la température de dénaturation T_d soient suffisantes pour une concentration donnée x_1 d'agent dénaturant. A la valeur minimale limite x_1 de la concentration en agent dénaturant correspond une valeur minimale limite de la température de dénaturation T_{dmin} , (figure 2).

En effectuant une série d'expériences A, B, ..., avec des concentrations x_i différentes, on s'aperçoit que l'ensemble des points de coordonnées (x_1 , T_{dmin}) est aligné sur une droite T_{dmin} qui définit la température minimale de dénaturation, en fonction de la concentration d'un agent dénaturant donné et pour une séquence donnée d'ADN à amplifier. La droite T_{dmin} ne concerne que le phénomène de dénaturation des duplex d'ADN initiaux ou formés par copie matricielle. Il n'y a pas d'interférence avec les processus d'élongation ou d'hybridation des amorces.

Par conséquent, la droite T_{dmin} ne dépend pas de la nature des amorces.

b) la courbe d'hybridation des amorces (pourcentage d'ADN double-brin formé entre la matrice et l'amorce, en fonction de la température (figure 2)).

Pour qu'il y ait amplification, il faut que les amorces puissent s'hybrider sur les simples chaînes d'ADN.

Pour une température donnée T_h , il ne faut pas que la concentration de l'agent dénaturant soit trop élevée parce qu'elle empêcherait l'hybridation. A la valeur limite maximale de la concentration x_2 en agent dénaturant, correspond 5 une valeur limite maximale de la température d'hybridation des amorces, $T_{h\max}$.

L'ensemble des points de coordonnées (x_2 , $T_{h\max}$) résultant d'une série d'expériences effectuées avec des concentrations différentes est aligné sur une droite $T_{h\max}$, qui 10 définit la température maximale d'hybridation des amorces en fonction de la concentration de l'agent dénaturant.

On observe que $T_{h\max}$ est approximativement parallèle à $T_{d\min}$ (agents dénaturants). Dans le cas des agents isodéstabilisants $T_{h\max}$ est encore une droite, mais elle 15 diverge par rapport à $T_{d\min}$ quand x croît (voir exemples).

$T_{h\max}$ dépend essentiellement de la nature des amorces. Si les amorces sont courtes, la droite $T_{h\max}$ est encore parallèle à $T_{d\min}$, mais elle est plus éloignée de $T_{d\min}$.

L'extrapolation de la droite $T_{d\min}$ à $x=0$ permet 20 de définir avec précision la valeur de T_{d0} pour le tampon standard, sans agent dénaturant. La pente de la droite donne le coefficient d'efficacité d de l'agent dénaturant, sur la cible d'ADN étudiée.

Pour que l'amplification soit très spécifique, 25 il faut que la température d'hybridation des amorces T_h soit proche de $T_{h\max}$. A température trop basse, la saturation des sites de la cible par les amorces est très élevée, mais la spécificité est plus faible.

c) la concentration d'agent dénaturant qu'il est 30 possible d'ajouter est limitée.

L'agent dénaturant (DMSO, formamide) est inhibiteur de l'ADN polymérase. A très faible quantité (1 %), il peut faciliter le déroulement des régions autocomplémentai-

res riches en G+C et permettre ainsi une meilleure copie de la matrice. Rapidement l'effet inhibiteur devient prépondérant. Par exemple, le DMSO à la concentration de 10 % inhibe la synthèse de l'ADN de 53 %, quand on emploie la Taq ADN polymérase à la température de 70°C. Pour du DMSO à 20 %, l'inhibition croît à 89 %.

- d) la réaction d'elongation des amorces est effectuée de préférence à une température T_e voisine de la température optimale de fonctionnement de l'ADN polymérase.
- 10 Le temps de la copie est ajusté à la vitesse de la polymérisation enzymatique dans les conditions expérimentales retenues. Cette vitesse s'exprime en nombre de bases/minute. Par exemple, si la vitesse est de 1 000 bases/min, il faudra au moins 4 minutes d'elongation pour amplifier un segment de 4 kilobases.

e) Le choix des températures optimales de fonctionnement PCR est possible et aisés, à partir des droites T_{dmin} et T_{hmax} (figure 3).

A la concentration en agent dénaturant ou isodé-
20 stabilisant x_0 , il faut que $T_d > T_{dmin_0} > T_{hmax_0} > T_h$.

T_{dmin_0} et T_{hmax_0} sont les valeurs de T_{dmin} et T_{hmax} pour $x=x_0$.

De préférence, T_e est voisin de la température optimale de fonctionnement de l'ADN polymérase, par exemple
25 70°C à 72°C avec la Taq ADN polymérase.

La PCR est une méthode complexe et simplement à partir des courbes de fusion des duplex ou des amorces et à plus forte raison de la connaissance de T_m seulement on ne peut pas prévoir actuellement l'effet favorable ou l'effet
30 inhibiteur d'une molécule sur l'amplification.

Des molécules qui semblent *a priori* favorables se révèlent décevantes.

C'est le cas du chlorure de tétraéthylammonium qui est un excellent agent d'isodéstabilisation mais qui inhibe totalement l'amplification PCR.

Cependant, aussi bien le procédé d'amplification que la méthode d'évaluation conformes à l'invention permettent effectivement de résoudre ce problème.

La présente invention a également pour objet un procédé de détection d'au moins une séquence d'acide nucléique cible, mettant en oeuvre au moins une étape d'amplification par une méthode d'amplification en chaîne, en présence d'amorces appropriées et une étape d'hybridation avec une sonde convenable, lequel procédé est caractérisé en ce que lors de l'étape d'amplification, l'on met en oeuvre un tampon conforme à l'invention.

Selon un mode de mise en oeuvre avantageux dudit procédé, lors de l'étape d'amplification, l'on met en oeuvre deux amorces portant un facteur de fixation, pour détecter la présence de la séquence d'acide nucléique amplifiée.

Après ladite amplification, cette double chaîne est dénaturée en présence d'un tampon conforme à l'invention, et les simple-brins fixés sur un support solide, puis une sonde portant un marqueur de détection est ajoutée. Le signal est amélioré pour les séquences difficiles à dénaturer.

Selon une disposition préférée de ce mode de mise en oeuvre, le facteur de fixation est la biotine ou un haptène et la détection est fluorescente, colorimétrique ou luminescente.

La mise en oeuvre d'un tampon tel que défini ci-dessus, dans un procédé d'amplification par PCR, par exemple, permet :

- d'amplifier des fragments ayant des longueurs de plusieurs dizaines de kb ; en conséquence, des virus ou des plasmides complets peuvent être amplifiés. Ceci va per-

mettre de les caractériser et de les étudier beaucoup plus aisément et notamment de faciliter l'étude des mutants d'intérêt thérapeutique et diagnostique. En particulier, les virus de la famille de l'herpès, qui renferment des séquences très riches en G+C, pourront être plus facilement amplifiés.

- dans le diagnostic médical, de détecter les porteurs de gènes avec de grandes insertions ou de grandes délétions. Ceci a un intérêt évident pour les maladies 10 génétiques et la cancérologie. Dans le processus de cancérisation, on observe, en effet, des remaniements chromosomiques avec des translocations pour lesquelles le point de fracture varie souvent de quelques kilobases. La possibilité d'amplifier des segments de grande taille va permettre de 15 diagnostiquer aisément ces réarrangements par des procédés semblables aux systèmes ELISA (procédé Amplicis® par exemple).

- l'étude des séquences régulatrices de l'expression génique : ADNc de grande taille relatifs aux 20 oncogènes.

- de réduire les coûts et d'accélérer le séquençage du génome humain. Dans la constitution des cartes génotypes, les fragments de quelques 30 à 40 kb qui sont incloables peuvent être obtenus par amplification avec des 25 oligonucléotides correspondant aux séquences frontières.

- pour des études de transferts de gènes, la construction complète du vecteur et des gènes, sans clonage. Les amorces des gènes J et cro peuvent être utilisées pour amplifier les inserts dans presque tous les vecteurs basés 30 sur le phage λ . Les inserts de cosmides pourront être amplifiés.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront

de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en oeuvre du procédé objet de la présente invention, ainsi qu'aux dessins annexés, dans lesquels :

- la figure 1 illustre l'intérêt, pour la PCR, 5 des agents isodéstabilisants qui facilitent la dénaturation des zones riches en paires de bases (G+C),

- la figure 2 représente le tracé des droites de température minimale de dénaturation des duplex $T_{d\min}$ et des droites de température maximale d'hybridation des amorces 10 $T_{h\max}$, en fonction de la quantité d'agent dénaturant ou d'agent isodéstabilisant,

- la figure 3 représente les domaines de fonctionnement de la PCR en fonction de la concentration en additif (dénaturant ou isodéstabilisant),

15 - la figure 4 représente les courbes des T_d et des T_h déterminées pour l'amplification d'un fragment de 870 pb avec des amorces de 50 bases de longueur dans un milieu renfermant de la N,N,N-triméthylglycine à différentes concentrations,

20 - la figure 5 représente les courbes des T_d et des T_h déterminées pour l'amplification d'un fragment de 870 pb avec des amorces de 50 bases de longueur dans un milieu renfermant du DMSO à différentes concentrations,

25 - la figure 6 représente les courbes des T_d et des T_h déterminées pour l'amplification d'un fragment de 870 pb avec des amorces de 50 bases de longueur dans un milieu renfermant du glycérol à différentes concentrations,

30 - la figure 7 représente les courbes des T_d et des T_h déterminées pour l'amplification d'un fragment de 870 pb avec des amorces de 50 bases de longueur dans un milieu renfermant de la N,N,N-triméthylglycine 1,5 M et du DMSO à différentes concentrations,

- la figure 8 représente les courbes des T_d et des T_h déterminées pour l'amplification d'un fragment de

810 pb avec des amorces de 20 bases de longueur dans un milieu renfermant de la N,N,N-triméthylglycine 1,5 M et du DMSO à différentes concentrations,

- la figure 9 illustre l'amplification d'une 5 région Ha-Ras du proto-oncogène humain c-Ha-Ras dans l'ADN de lymphocytes en présence de différents agents,

- la figure 10 illustre l'amplification d'une 10 région Ha-Ras du proto-oncogène humain c-Ha-Ras dans l'ADN extrait de différentes tumeurs, de lymphocytes et d'une lignée cellulaire MDA.

Les figures 2 à 8 illustrent, pour chaque amplification, les résultats positifs (+) ou négatifs (0) en fonction des températures et/ou de la concentration en agents dénaturants et/ou isodéstabilisants.

15 Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

Dans les exemples qui suivent, les études comparatives 20 des températures minimales de dénaturation des duplex néosynthétisés (T_{dmin}) et des températures maximales d'hybridation des amorces (T_{hmax}), en fonction des agents isodéstabilisants et/ou dénaturants, utilisés ont été effectués à partir de l'amplification d'un fragment de 870 pb du 25 génome de *Mycobacterium tuberculosis*, qui est caractérisé par une grande proportion de bases GC : 64 %.

Le fragment amplifié (séquence A) est le suivant :

			400	410	420	
			CCGA	TCATCAGGGC	CACCGCGAGG	
	430	440	450	460	470	480
	GCCCGATGG TTTGCGGTGG GGTGTCGAGT CGATCTGCAC ACAGCTGACC GAGCTGGTG					
5	490	500	510	520	530	540
	TGCGCATCGC CCCATCGACC TACTACGACC ACATCAACCG GGAGCCCAGC CGCCGCGAGC					
	550	560	570	580	590	600
	TGCAGATGG CGAACTCAAG GAGCACATCA GCCGCGTCCA CGCCGCCAAC TACGGTGT					
	610	620	630	640	650	660
	ACGGTGCCCC CAAAGTGTGG CTAACCCCTGA ACCGTGAGGG CATCGAGGTG GCCAGATGCA					
10	670	680	690	700	710	720
	CCGTCGAACG GCTGATGACC AAACCTGGCC TGTCCGGGAC CACCCGCGGC AAAGCCCGCA					
	730	740	750	760	770	780
	GGACCAACGAT CGCTGATCCG ECCACAGCCC GTCCCCCGA TCTCGTCCAG CGCCGCTTCG					
	790	800	810	820	830	840
	GACCACCAACG ACCTAACCGG CTGTGGTAG CAGACCTCAC CTATGTGTAG ACCTGGGCAG					
15	850	860	870	880	890	900
	GGTTCGCCTA CGTGGCCTTT GTCACCGACG CCTACGTCGC AGGATCCTGG GCTGGCGGGT					
	910	920	930	940	950	960
	CGCTTCCACG ATGGCCACCT CCATGGTCCT CGACCGATC GAGCAAGCCA TCTGGACCCG					
	970	980	990	1000	1010	1020
	CCAACAAGAA GGCGTACTCG ACCTGAAAGA CGTTATCCAC CATAACGGATA GGGGATCTCA					
20	1030	1040	1050	1060	1070	1080
	GTACACATCG ATCCGGTTCA GCGAGCGGCT CGCCGAGGCA GGCAATCCAAC CGTCGGTCGG					
	1090	1100	1110	1120	1130	1140
	AGCGGTGGA AGCTCCTATG ACAATGCACT AGCCGAGACG ATCAACGGCC TATACAAGAC					
	1150	1160	1170	1180	1190	1200
25	CGAGCTGATC AAACCCGGCA AGCCCTGGCG GTCCATCGAG GATGTGAGT TGGCCACCGC					
	1210	1220	1230	1240	1250	1260
	GCGCTGGTC GACTGGTTCA ACCATCGCCG CCTCTACCAAG TACTGGCGCG ACGTCCCAGC					
	1266					
	GGTCGA					

Les amorces employées sont des oligonucléotides de 50 bases de longueur, qui encadrent le fragment précédent.

L'amorce 1 de séquence :

5' CCG ATC ATC AGG GCC ACC GCG AGG GCC CCG ATG
GTT TGC GGT GGG GTG TC 3',

comporte 68 % de bases GC et a un T_m de 93,3°C, calculé conformément à la formule 2, sans agent dénaturant.

L'amorce 2 de séquence :

5' TCG ACC GGC GGG ACG TCG CCG CAG TAC TGG TAG
AGG CGG CGA TGG TTG AA 3',

comporte 66 % de bases GC et a un T_m de 90,9°C, calculé conformément à la formule 2, sans agent dénaturant.

Toutes les amplifications ont été effectuées dans un tampon d'amplification standard (Tris HCl 10 mM pH 8,5, 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂, 200 μ M de chaque dATP, dCTP, dGTP et dTTP, 4 pmoles de chacune des amorces, 2 U de Taq DNA polymérase), auquel sont ajoutés les divers agents (AI et AD) selon l'invention, mis en oeuvre à différentes concentrations.

Le critère d'amplification minimale acceptable a été fixé comme suit : l'apparition bien visible d'une bande d'ADN double-brin après séparation électrophorétique et révélation au bromure d'éthidium sous irradiation UV, ayant les caractéristiques de longueur et de séquence exactes après 40 cycles d'amplification. Pour que les résultats soient parfaitement cohérents, le même segment d'ADN et les mêmes amorces sont utilisées. Dans les expériences positives qui ont été conduites, l'amplification de la cible était supérieure à 100 000.

Pour évaluer l'efficacité des additifs (AI et AD) sur l'amplification en chaîne, une étude comparative, suivant quatre modalités ont été réalisées, avec les amorces 1 et 2 et le duplex A précités :

- en présence seulement d'un agent dénaturant ou en présence de deux agents dénaturants (effet de compétition).

tion), d'une part et d'autre part, conformément à l'invention :

- en présence d'un agent isodéstabilisant comme seul additif ou
- 5 - en présence d'un agent isodéstabilisant et d'un agent dénaturant.

EXEMPLE 1 : Amplification en présence d'au moins un agent dénaturant.

- 10 1) tampon contenant en tant qu'additif, seulement un agent dénaturant.

Avec la séquence A, les amorces 1 et 2 et sans que cela soit limitatif, il est possible de tracer la droite T_{dmin} de 0 à 20 % en DMSO avec précision.

15 Dans la zone à faible teneur en DMSO, quand la température Th de la PCR dépasse une valeur supérieure à 83°C, il est impossible de déterminer Th_{min} parce que la Taq ADN polymérase ne fonctionne plus correctement (pour une valeur de DMSO inférieure à 5 %), puisqu'on travaille à $Te=Th$.

20 Il est possible de tracer la droite Th_{max} entre 7 et 20 % de DMSO.

- 25 1) tampon sans agent dénaturant ou isodéstabilisant :

$$T_{d_0} \text{ (°C)} = 92,5^{\circ}\text{C}$$

2) tampon avec DMSO seulement :

$$T_{dmin} \text{ (°C)} = 92,5 - 0,62 \text{ (% DMSO)}$$

$$\text{limite DMSO} = 15 \text{ %}$$

3) tampon avec glycérol seulement :

$$T_{dmin} \text{ (°C)} = 92,5 - 0,30 \text{ (% glycérol)}$$

30 limite glycérol = 30 %.

Les droites T_{dmin} et Th_{max} (figures 5 et 6) ont été établies pour des concentrations en chaque agent dénaturant utilisé seul (DMSO de 0 à 20 % et glycérol de 0 à 40 %). Th_{max} n'est tracé que pour la zone où Th est inférieur à 40 %.

rieure à 83°C puisqu'on effectue la réaction enzymatique d'elongation des amorces à la température T_e qui est égale à T_h (résultats positifs : + ; résultats négatifs : 0).

2) en présence de deux agents dénaturants :

5 effet de compétition :

L'expérience est effectuée en ajoutant au milieu réactionnel renfermant un agent dénaturant en concentration déterminée, un deuxième agent dénaturant avec une gamme de concentrations croissantes. L'ensemble des échantillons est 10 amplifié en parallèle avec des amorces longues à deux températures T_h et T_d .

A titre d'exemple, et sans que ce soit limitatif avec la séquence A, les amorces 1 et 2 et les tampons standards, les valeurs sont les suivantes :

15 1) tampon avec glycérol 5 % et DMSO variable :

T_{dmin} (°C) = 91,2-0,55 (% DMSO)

2) tampon avec glycérol 8 % et DMSO variable :

T_{dmin} (°C) = 90,5-0,55 (% DMSO).

La pente observée (0,55) de T_{dmin} est plus 20 faible que celle qu'on obtient avec DMSO pur (0,62). Ceci montre qu'il n'y a pas additivité de l'action des deux agents dénaturants. On peut émettre l'hypothèse qu'ils sont en compétition pour les mêmes sites de l'ADN.

EXEMPLE 2 : Amplification en présence de N,N,N triméthylglycine.

L'amplification du fragment de 870 pb a été étudiée pour différentes concentrations de N,N,N triméthylglycine variant de 0 à 3 M.

On a établi les droites T_{dmin} et T_{hmax} pour la 30 N,N,N triméthylglycine seule par une série d'amplifications dont les paramètres sont les suivants : après une première dénaturation de 5 minutes à 94°C, on effectue une série de 40 cycles d'amplification (dénaturation 1 min 30 à <94 à 85°C>, hybridation 1 min 30 à <80 à 50°C>, elongation

1 min 30 à <80 à 72°C>). Ces cycles sont suivis d'une élongation supplémentaire de 5 minutes à la température d'élongation de l'amplification.

L'amplification est ensuite analysée sur gel 5 d'agarose 2 % en tampon TAE (Tris HCl 40 mM pH 7,8, acétate de sodium 5 mM, EDTA 1 mM) par fluorescence avec le bromure d'éthidium. La longueur des bandes est contrôlée par rapport à des témoins de longueur (marqueur VIII de Boehringer Mann-heim).

10 Pour chaque amplification, les résultats positifs (+) ou négatifs (0), en fonction des températures et de la concentration en N,N,N triméthylglycine sont rapportés dans un diagramme (figure 4), et à la fin de la série 15 d'amplification les droites T_{dmin} et T_{hmax} peuvent être tracées. T_d est évalué à 92,7°C.

La N,N,N triméthylglycine a donné des résultats intéressants et la même méthodologie qui a été exposée pour déterminer les courbes T_{dmin} et T_{hmax} a été utilisée pour analyser l'effet de la N,N,N triméthylglycine. L'ajout de 20 N,N,N triméthylglycine au tampon d'amplification a permis de diminuer les températures PCR minimales de dénaturation (T_{dmin}) des ADN double-brins et les températures maximales d'hybridation des amorces (T_{hmax}). La droite T_{dmin} peut être tracée avec précision de 0 à 2,5 M et la droite T_{hmax} (qui 25 n'est pas parallèle à T_{dmin}), seulement de 1 à 2,5 M. En dessous de 1 M en N,N,N triméthylglycine, le T_{hmax} est trop élevé pour un fonctionnement correct de l'enzyme ($T_e = T_{hmax_0}$).

30 Lorsque le tampon comprend de la N,N,N triméthylglycine, la réaction est à une concentration de 1,5 M, les résultats obtenus sont les suivants avec la séquence A et les amorces 1 et 2 :

a) tampon sans agent dénaturant ou isodéstabilisant :

T_{dmin} ($^{\circ}C$) = 92,7 $^{\circ}C$

T_{hmax} ($^{\circ}C$) = limitation 83 $^{\circ}C$ (extrapolation
5 89 $^{\circ}C$).

b) tampon avec N,N,N triméthylglycine 1,5 M :

T_{dmin} ($^{\circ}C$) = 89

T_{hmax} ($^{\circ}C$) = 82,5.

L'amplification perd de son efficacité à 2,5 M
10 en N,N,N triméthylglycine. En fait, le gain obtenu sur le
 T_{dmin} en PCR est de 92,7-89 $^{\circ}C$ =3,7 $^{\circ}C$ (voir figure 4).

EXEMPLE 3 : Amplification en présence d'un agent isodéstabilisant et d'un agent dénaturant :

Cas de la N,N,N triméthylglycine et de diméthyl-
15 sulfoxyde (DMSO) : **effet synergique :**

La supériorité du mélange DMSO-N,N,N triméthyl-
glycine apparaît de différentes façons par l'analyse des
droites obtenues.

1) N,N,N triméthylglycine 1,5 M-DMSO (N,N,N
20 triméthylglycine pure, T_{dmin} : 89 $^{\circ}C$, voir exemple 2 ; pente
DMSO 0,76) :

T_d ($^{\circ}C$) = 89-0,76 (% DMSO)

limite DMSO : 15 %.

2) N,N,N triméthylglycine 1,5 M -glycérol :

25 T_d ($^{\circ}C$) = 89-0,35 (% glycérol)

limite glycérol 20 %.

Conformément à l'invention et sans que cela soit
limitatif, avec le duplex A des amorces 1 et 2,
l'amplification PCR est réalisée avec un excellent résultat
30 à deux températures $T_d=82^{\circ}C$ et $T_h=70^{\circ}C$, dans le tampon
d'amplification classique contenant 1,5 M en N,N,N
triméthylglycine et 10 % de DMSO comme additifs. Ceci repré-
sente un abaissement de plus de 10 $^{\circ}C$ par rapport au tampon
sans additif.

EXEMPLE 4 : Amplification en présence de N,N,N triméthylglycine et de DMSO.

a) Détermination des courbes T_{dmin} et T_{hmax} avec des amorces de 50 bases :

5 Des amplifications ont été effectuées en présence de N,N,N triméthylglycine 1,5 M, de tampon d'amplification standard et avec des concentrations variables de DMSO (de 0 à 18 %), de manière parallèle dans les différents puits du thermocycleur.

10 Les conditions d'amplification de chaque série sont différentes : après une dénaturation initiale de 5 min à 94°C, on effectue 40 cycles (dénaturation 1 min 30 pour une série de températures s'échelonnant de 90 à 78°C, hybridation 1 min 30 pour une série de températures s'échelonnant 15 de 78 à 60°C et élongation 1 min 30 pour des températures s'échelonnant de 78 à 72°C). Suit une élongation finale de 5 minutes à la température d'élongation.

Après amplification, on effectue une séparation électrophorétique sur gel d'agarose 2 % dans du tampon TAE.
20 On fait apparaître les bandes d'amplification par fluorescence avec le bromure d'éthidium.

Lorsque l'amplification est positive, c'est que les deux températures T_d et T_h conviennent. Une amplification négative pour une concentration en DMSO plus faible 25 correspond à des conditions où la température de dénaturation est inférieure à la température T_{dmin} ; une amplification négative pour une concentration de DMSO plus élevée correspond à des conditions où la température d'hybridation est supérieure à T_{hmax} .

30 On peut ainsi tracer le diagramme des températures T_d et T_h pour les différentes concentrations de DMSO (figure 7). On obtient ainsi deux droites pratiquement parallèles. Leurs ordonnées à l'origine sont identiques aux valeurs déterminées expérimentalement dans l'exemple précédent.

dent pour 1,5 M en N,N,N triméthylglycine : Td=89°C et Th=78,2°C.

b) Détermination des courbes Td et Th pour des amorces plus courtes :

5 On effectue les mêmes séries d'amplifications que dans l'exemple précédent mais à partir d'amorces de 20 bases de longueur. Le fragment d'amplification est de 810 paires de bases, inclus dans le fragment précédent, le contenu en bases GC est de 63,2 %. Les amorces sont :

10 - amorce 3 : 5' ATG GTT TGC GGT GGG GTG TC 3'
Tm=59,0°C

- amorce 4 : 5' TAG AGG CGG CGA TGG TTG AA 3'
Tm=57,9°C.

15 Le milieu et les conditions d'amplification (températures et nombre de cycles) sont les mêmes que dans l'exemple précédent. Seules les amorces sont différentes.

20 Les résultats obtenus sont rapportés dans la figure 8. On remarque que la droite des Td est superposable à la précédente. Ce résultat montre que la température de dénaturation concerne le fragment d'amplification et non les amorces, et le fragment amplifié ici est pratiquement identique à celui de l'exemple précédent. En revanche, la droite des Th est abaissée par rapport à celle de l'exemple précédent. Cela est dû à ce que les amorces étant plus courtes, 25 leurs températures d'hybridation sont plus basses.

EXAMPLE 5 : Comparaison de l'efficacité de l'additif N,N,N triméthylglycine-DMSO à l'additif glycérol-DMSO.

30 De façon surprenante, le mélange N,N,N triméthylglycine-DMSO donne des résultats bien supérieurs aux mélanges d'agents dénaturants, actuellement connus. En effet :

1) la N,N,N triméthylglycine seule, à la concentration de 1,5 M, dans un tampon non optimisé, donne des résultats très proches du mélange glycérol 8 %-DMSO 5 %

($T_{dmin}=89^{\circ}C$ et $88^{\circ}C$ respectivement, avec le duplex A de 870 paires de bases et de 0,67 % en G+C et les amorces 1 et 2).

2) la N,N,N triméthylglycine réduit considérablement l'influence sur le T_m des zones riches en (G+C) selon l'équation ΔT_m ($^{\circ}C$) qui a été proposée. Il est évident que son influence locale sur le T_m de la chaîne d'ADN est d'autant plus grande que la teneur en (G+C) est élevée et par conséquent sur les zones résiduaires d'appariement après l'étape de dénaturation effectuée à la température T_d qui conditionnent beaucoup l'amplification des fragments longs. L'addition de la N,N,N triméthylglycine seule a permis de réaliser l'amplification de séquences minisatellites à très forte teneur en G+C de longueur voisine de 2 kb (voir exemple 6) alors qu'elle n'a pas été obtenue avec l'addition de 10 % de DMSO. Ceci signifie que l'action de la N,N,N triméthylglycine est plus puissante que le DMSO dans les segments à très forte teneur en G+C et supérieure à ce qui a été déterminé pour le fragment A d'ADN.

3) pour les mélanges d'agents dénaturants, on observe un effet de compétition (pente de T_{dmin} du DMSO en présence de glycérol 5 %, $a=0,55$) alors que pour le mélange N,N,N triméthylglycine DMSO, on observe un effet synergique inattendu (pente de T_{dmin} du DMSO, $a=0,76$). La pente du DMSO pur est intermédiaire ($a=0,62$).

4) la présence de N,N,N triméthylglycine ne semble pas modifier les propriétés du DMSO sur la PCR. Additionné au tampon d'amplification contenant déjà de la N,N,N triméthylglycine, le DMSO n'apparaît pas davantage inhibiteur que s'il était additionné à un tampon sans additif. Ceci ouvre une possibilité extraordinaire pour diminuer la température de dénaturation des duplex en PCR et, par conséquent, faciliter l'amplification des gènes de grandes dimensions qui ont très fréquemment, une ou plusieurs régions à teneur en G+C très élevées.

EXEMPLE 6 : Amplification selon l'invention, en présence d'amorces courtes.

On désigne par amorces courtes, celles qui sont actuellement couramment utilisées dans la PCR, c'est-à-dire 5 d'une vingtaine de bases et d'un T_m de 50°C à 63°C.

L'enzyme thermostable, par exemple la Taq ADN polymérase, ne fonctionnant correctement qu'à partir de températures bien supérieures voisines de 70°C, il est impossible d'effectuer la réaction d'elongation des amorces à la 10 même température que celle de leur hybridation. Il faut insérer une température intermédiaire T_e (vers 72°C pour la Taq ADN polymérase). La droite T_{dmin} est la même que celle qui est obtenue avec les amorces longues, puisqu'elle ne dépend que du duplex à amplifier. La droite T_{hmax} est encore 15 parallèle à T_{dmin} , mais elle est plus éloignée de T_{dmin} que dans le cas des amorces longues.

A titre de comparaison et sans que ce soit limitatif, la séquence A a été amplifiée par PCR avec les sondes 1 et 2 d'une part, et les sondes 3 et 4.

20 1) Tampon sans agent dénaturant ou déstabilisant :

T_{dmin} (°C) = 92,5 (avec les amorces 1 et 2 ou 3 et 4)

25 amorces 1 et 2, T_{hmax} (°C) = 83,C (limitation due à l'enzyme)

amorces 3 et 4, T_{hmax} (°C) = 77,5.

2) Tampon avec N,N,N triméthylglycine 1,5 M :

30 T_{dmin} (°C) = 89 quel que soit le couple d'amorces

T_{hmax} (°C) = 82,5 (amorces 1 et 2)

T_{hmax} (°C) = 71 (amorces 3 et 4).

3) Tampon avec N,N,N triméthylglycine 1,5 M et DMSO :

35 T_{dmin} (°C) = 89-0,76 (% DMSO)

Th_{max} (°C) = 82,5-0,76 (% DMSO)

Th_{max} (°C) = 71-0,76 (% DMSO).

EXEMPLE 7 : Amplification de minisatellites en présence de N,N,N triméthylglycine.

5 Une région minisatellite Ha-Ras du proto-oncogène humain c-Ha-Ras a été amplifiée en présence de N,N,N triméthylglycine. Cette région correspond à quatre allèles principaux (92 à 95 % de la population), de longueur supérieure à 1 kb.

10 Cette région est caractérisée par des répétitions d'une séquence consensus de 28 paires de bases. Le nombre variable de ces répétitions définit les différents allèles.

15 Ce fragment répété est très riche en GC, et les amorces d'amplification qui encadrent cette région aussi :

- fragment répété : 5' CAC TCC CCC TTC TCT CCA
GGG GAC GCC A 3', (GC)=67,9 %

- amorce 1 : 5' GAG CTA GCA GGG CAT GCC GC 3'
(GC)=70 %, T_m=61,6°C,

20 - amorce 2 : 5' AGC ACG GTG TGG AAG GAG CC 3'
(GC)=65 %, T_m=64,5°C.

a) Amplification des minisatellites de l'ADN de lymphocytes :

Une amplification du fragment Ha-Ras à partir de 25 50 ng d'ADN de lymphocytes dans 50 µl de solution d'amplification (Kit AM-TAQ, CIS BIO INTERNATIONAL) et en présence de 15 pmoles de chacune des amorces a été effectuée sans adjonction de réactif (1), avec addition de N,N,N triméthylglycine 1,5 M (2), avec addition de DMSO 10 % (3), 30 avec addition de DMSO 5 % (4) ou avec addition de N,N,N triméthylglycine 1,5 M et DMSO 5 % (5) (figure 9). Dans cette figure 9, les bandes VIII et VI représentent respectivement le marqueur de longueur VIII et le marqueur de longueur VI de Boehringer.

Après une dénaturation de 5 minutes à 94°C, on effectue 30 cycles d'amplification (dénaturation 94°C, 1 min 30, hybridation 60°C, 1 min 30, et élongation 70°C, 2 min). Après une élongation supplémentaire de 5 minutes à 5 70°C, les amplifications sont analysées sur gel d'agarose et fluorescence par le bromure d'éthidium.

Les résultats obtenus sont montrés sur la figure 9. On note que seules les amplifications en présence de N,N,N triméthylglycine aboutissent à la mise en évidence de 10 l'allèle majoritaire (1 kb). De plus, le mélange N,N,N triméthylglycine-DMSO donne un signal plus net et plus intense. Les amplifications en présence de DMSO seul (5 ou 10 %) ne permettent aucune mise en évidence des différents allèles. Ce réactif seul ne permet pas une bonne dénaturation 15 de la séquence riche en GC.

b) Amplification des allèles Ha-Ras pour de l'ADN extrait de tumeurs :

Les conditions d'amplifications précédentes, en présence de N,N,N triméthylglycine 1,5 M et de DMSO 5 % sont 20 utilisées pour amplifier les allèles d'une série d'ADN humains extraits soit de tumeurs (bandes 2, 4 et 6), soit du tissu sain correspondant (bandes 3 et 5), et les ADN extraits des lymphocytes (bande 1) et d'une lignée cellulaire MDA (bande 7).

25 Les résultats ont été la mise en évidence des trois allèles principaux : 1 kb, 1,7 kb et >2 kb (figure 10) dans tous les ADNs extraits, avec une excellente spécificité : bande 1 : lymphocytes (allèle 1 kb) ; bande 2 : tumeur du sein (allèle 1 kb) ; bande 3 : patient 1, colon 30 sain (allèles 1 kb et 1,7 kb) ; bande 4 : patient 1, tumeur du colon (allèles 1 kb et 1,7 kb) ; bande 5 : patient 2, colon sain (allèles 1 kb et >2 kb) ; bande 6 : patient 2, tumeur du colon (allèles 1 kb et >2 kb) ; bande 7 : lignée MDA (allèle 1 kb). Les bandes VIII et VI représentent

respectivement le marqueur de longueur VIII et le marqueur de longueur VI de Boehringer.

EXEMPLE 8 : Application d'un tampon conforme à l'invention à la réaction de ligation en chaîne :

5 Pour le procédé d'amplification LCR (ligase chain reaction) utilisant les tampons d'amplification tels que définis ci-dessus et qui fonctionne à deux températures T_d et T_h , comme la PCR, les courbes $T_{d\min}$ et $T_{h\max}$ ont été définies.

10 La méthode est aussi appliquée au procédé d'amplification LCR avec réparation utilisant les tampons d'amplification tels que définis ci-dessus.

EXEMPLE 9 : Application d'un tampon conforme à l'invention à une méthode de détection d'une séquence d'acide nucléique.

15 Une réaction PCR comportant deux amorces portant un facteur de fixation est effectuée avec la séquence A et les amorces 1 et 2 pour détecter la présence d'une séquence d'acides nucléiques. Après amplification, cette double chaîne est dénaturée en présence des tampons décrits
20 N,N,N triméthylglycine 1,5 M et DMSO 5 % et les simple-brins fixés sur un support solide, recouvert d'avidine. Puis une sonde portant un marqueur de détection est ajoutée. Le signal colorimétrique est amélioré et il apparaît que ceci se confirme pour les séquences difficiles à dénaturer. Cet
25 exemple est donné à titre indicatif et n'est pas exhaustif. D'autres modes avantageux de fixation et de détection peuvent être utilisés avec succès.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écartez du cadre, ni de la portée de la présente invention.

REVENDICATIONS

1°) Tampon, apte à être mis en oeuvre dans un procédé d'amplification d'au moins une séquence cible d'acide nucléique, du type comprenant n cycles, chacun desdits cycles incluant une étape de dénaturation de la séquence cible double-brin, réalisée à une température de dénaturation T_d , une étape d'hybridation entre la séquence cible simple-brin et au moins une amorce appropriée, réalisée à une température d'hybridation T_h et une étape d'élongation de l'amorce ayant hybridé, en présence d'une enzyme d'élongation d'acide nucléique et à une température d'élongation T_e , lequel tampon est caractérisé en ce qu'il comprend, outre les constituants d'un tampon d'amplification standard, au moins un agent isodéstabilisant (AI), éventuellement associé à au moins un agent dénaturant (AD), présents à des concentrations aptes à réduire la température de fusion T_m de la séquence cible d'acide nucléique double-brin d'au moins une quantité $\Delta T_{m_{AI}}$, conformément à la formule 1 :

$$20 \quad \Delta T_{m_{AI}} = f[(\% G+C), (\text{molarité de AI})],$$

pour diminuer au moins la température de dénaturation T_d de ladite séquence cible d'acide nucléique double-brin, et ce tout en permettant un bon fonctionnement de la réaction enzymatique d'élongation des amorces.

25 2°) Tampon selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un agent isodéstabilisant (AI) et éventuellement au moins un agent dénaturant (AD) à des concentrations aptes à diminuer la température de fusion T_m de la séquence cible d'acide nucléique double-brin, conformément à la formule 4 ci-après :

$$T_m (\text{°C}) = 81,5 + 0,41(\% G+C) - \Delta T_{m_{AI}} - 675/N + 16,6 \log M - \Delta T_{m_{AD}} \text{ (formule 4)},$$

dans laquelle :

$\Delta T_{m_{AI}}$ a la même signification que ci-dessus (formule 1),

$$\Delta Tm_{AD} = d(\% \text{ agent dénaturant}) \text{ (formule 3)}$$

M : molarité du/des cations monovalents présents dans le tampon,

N : nombre de nucléotides, et

5 d : coefficient d'efficacité de l'agent dénaturant (AD).

3°) Tampon selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce que l'agent isodéstabilisant est sélectionné dans le groupe constitué par les halogénures d'alkylammonium et les ions dipolaires (zwitterions).

10 4°) Tampon selon la revendication 3, caractérisé en ce que le zwitterion est, de préférence la N,N,N triméthylglycine.

15 5°) Tampon selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que l'agent dénaturant est sélectionné dans le groupe constitué par le diméthylsulfoxyde (DMSO), le glycérol, le formamide, le diméthylformamide (DMF), les uréides, les polyols et les détergents.

20 6°) Tampon selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'il comprend un mélange d'un agent isodéstabilisant et d'un agent dénaturant.

7°) Tampon selon la revendication 6, caractérisé en ce que ledit mélange est constitué de N,N,N triméthylglycine et de DMSO.

25 8°) Tampon selon la revendication 6 ou la revendication 7, caractérisé en ce que la concentration en N,N,N triméthylglycine est comprise entre 0,05 et 4 M, de préférence entre 1 et 2,5 M, et la concentration en DMSO est comprise entre 0,5 et 15 %, de préférence entre 5 et 10 %.

30 9°) Tampon selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'il comprend un mélange d'un agent isodéstabilisant et de deux agents dénaturants.

10°) Tampon selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'il comprend un mélange constitué de N,N,N triméthylglycine, de DMSO et de glycérol.

11°) Tampon selon la revendication 10, caractérisé en ce que la concentration en N,N,N triméthylglycine est comprise entre 0,05 et 4 M, de préférence entre 1 et 2,5 M, la concentration en DMSO est comprise entre 0,5 et 5 15 %, de préférence entre 5 et 10 % et la concentration en glycérol est comprise entre 1 et 30 %, de préférence entre 3 et 20 %.

12°) Tampon selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce qu'il est mis en oeuvre 10 dans un procédé d'amplification en chaîne par polymérase.

13°) Tampon selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce qu'il est mis en oeuvre dans un procédé d'amplification en chaîne par ligase.

14°) Tampon selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce qu'il est mis en oeuvre 15 dans un procédé d'amplification en chaîne par ligase avec réparation.

15°) Procédé d'amplification en chaîne d'au moins une séquence cible d'acide nucléique, caractérisé en 20 ce qu'il met en oeuvre un tampon selon l'une quelconque des revendications 1 à 14

16°) Procédé selon la revendication 15, pour l'amplification en chaîne, du type PCR comprenant n cycles, chacun desdits cycles incluant une étape de dénaturation de 25 la séquence cible double-brin, réalisée à une température de dénaturation Td, une étape d'hybridation entre la séquence cible simple-brin et au moins une amorce appropriée, réalisée à une température d'hybridation Th et une étape d'elongation de l'amorce hybridée, en présence d'une ADN 30 polymérase et à une température d'elongation Te, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il met en oeuvre un tampon selon la revendication 12.

17°) Procédé d'amplification selon la revendication 12, caractérisé en ce que chaque cycle est effectué

avec deux températures T_d (température de dénaturation) et T_h (température d'hybridation) = T_e (température d'élongation), ledit procédé étant, de préférence, mis en oeuvre en présence d'amorces comprenant plus de 30 nucléotides, et
5 dont la température de fusion T_m est élevée.

18°) Procédé d'amplification LCR (ligase chain reaction) d'au moins une séquence cible d'acide nucléique, caractérisé en ce qu'il met en oeuvre un tampon d'amplification selon la revendication 13.

10 19°) Procédé d'amplification LCR avec réparation, caractérisé en ce qu'il met en oeuvre un tampon d'amplification selon la revendication 14.

20 20°) Méthode d'évaluation des conditions optimales à mettre en oeuvre dans un procédé d'amplification selon 15 l'une quelconque des revendications 15 à 19, caractérisée en ce qu'elle comprend le tracé du diagramme des températures définissant les domaines de T_d et T_h (température maximale et minimale de l'amplification), conformément aux étapes suivantes :

20 (1) la réalisation :

- de la droite des températures minimales de dénaturation ($T_{d\min}$) des duplex d'acide nucléique cible, du type $T_{d\min} = T_{d_0} - by_n$, dans laquelle $T_{d\min}$ représente la valeur de la température minimale de dénaturation pour une concentration y_n en agent isodéstabilisant, T_{d_0} représente la valeur de la température minimale de dénaturation en l'absence d'additif (agent déstabilisant ou agent dénaturant) et b représente la pente de la droite et

- de la droite des températures maximales d'hybridation des amorces ($T_{h\max}$), en fonction de la concentration y_n en agent isodéstabilisant et en l'absence d'agent dénaturant,

(2) la sélection d'au moins une concentration y_n en agent isodéstabilisant, pour laquelle la température de dénaturation T_d et la température d'hybridation T_h satisfont aux conditions suivantes : $T_d > T_{dmin_n} > T_{hmax_n} > T_h$,

5 (3) la réalisation :

- de la droite des températures minimales de dénaturation (T_{dmin}) des duplex d'acide nucléique cible, du type $T_{dmin_i} = T_{d_0} - ax_i$, dans laquelle T_{dmin_i} représente la valeur de la température minimale de dénaturation pour une concentration x_i en agent dénaturant et pour la concentration y_n choisie en agent isodéstabilisant à l'étape (2), T_{d_0} représente la valeur de la température minimale de dénaturation en l'absence d'additif (agent déstabilisant ou agent dénaturant) et a représente la pente de la droite et

10 15 - de la droite des températures maximales d'hybridation des amorces (T_{hmax_i}), en fonction de la concentration en agent dénaturant x_i et pour la concentration y_n sélectionnée à l'étape (2) en agent isodéstabilisant,

20 (4) la sélection d'au moins une concentration en agent dénaturant, pour laquelle T_d et T_h satisfont également aux conditions suivantes : $T_d > T_{dmin_n} > T_{hmax_n} > T_h$ et

25 (5) la préparation d'un tampon d'amplification conforme à l'invention, dans lequel l'agent isodéstabilisant et l'agent dénaturant sont aux concentrations sélectionnées aux étapes (2) et (4) ci-dessus.

20 30 21°) Méthode d'évaluation selon la revendication 20, caractérisée en ce que lorsque les amorces sont courtes et de point de fusion faible, une étape d'elongation intermédiaire des amorces à une température T_e est mise en oeuvre, avec $T_d > T_e > T_h$ et avec T_e , le plus près possible de la température optimale de fonctionnement de l'enzyme d'elongation.

22°) Procédé de détection d'au moins une séquence d'acide nucléique cible, mettant en oeuvre au moins une étape d'amplification par une méthode d'amplification en chaîne en présence d'amorces appropriées et une étape 5 d'hybridation avec une sonde convenable, lequel procédé est caractérisé en ce que lors de l'étape d'amplification, l'on met en oeuvre un tampon selon l'une quelconque des revendications 1 à 14.

23°) Procédé selon la revendication 22, caracté-
10 risé en ce que lors de l'étape d'amplification, l'on met en oeuvre deux amorces portant un facteur de fixation, pour détecter la présence de la séquence d'acide nucléique amplifiée.

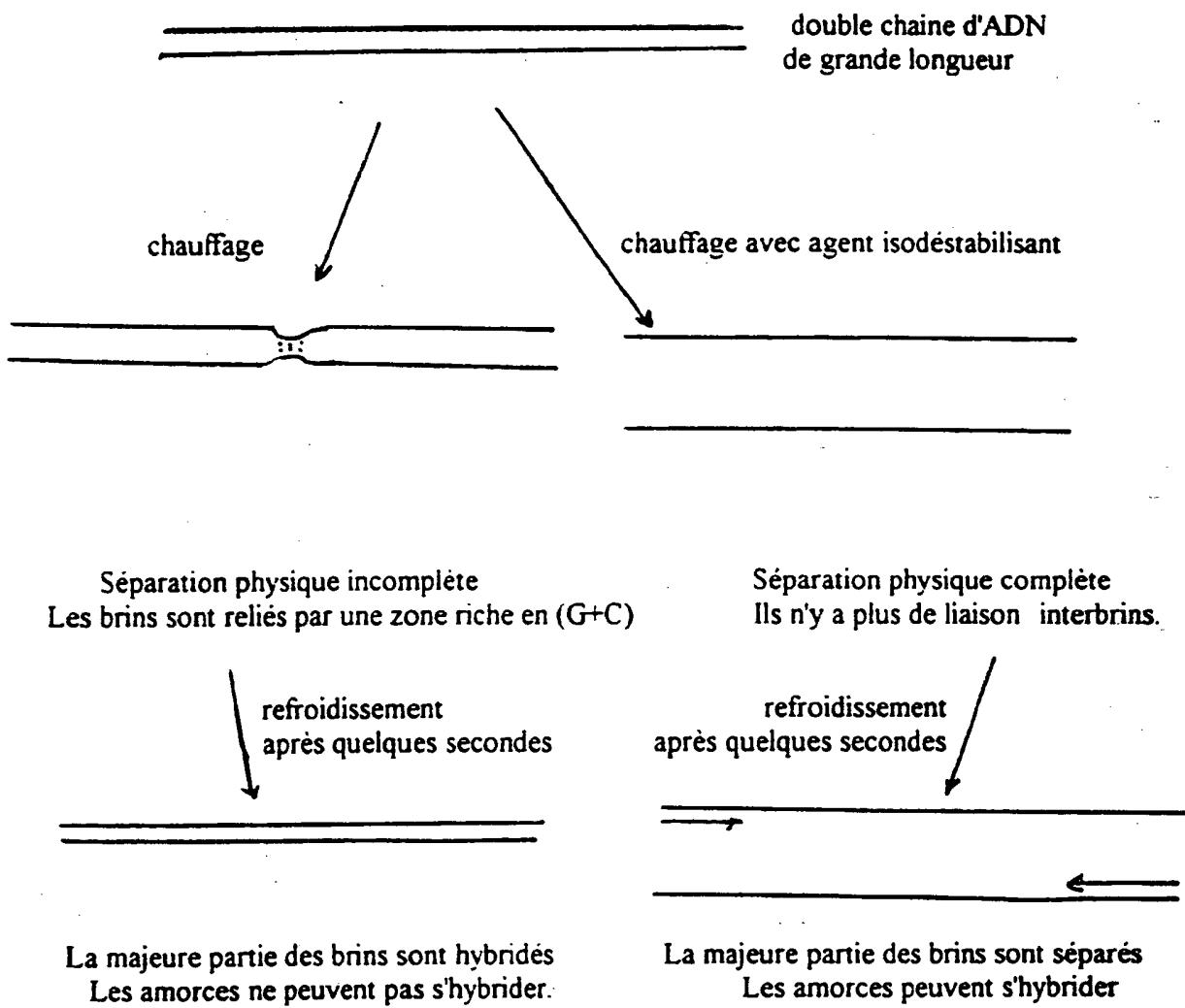
24°) Procédé selon la revendication 22 ou la
15 revendication 23, caractérisé en ce qu'après ladite amplification, cette double chaîne est dénaturée en présence d'un tampon selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, et les simple-brins fixés sur un support solide, puis une sonde portant un marqueur de détection est ajoutée.

25°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 22 à 24, caractérisé en ce que le facteur de fixation est la biotine ou un haptène et la détection est fluorescente, colorimétrique, luminescente ou électrochimique.

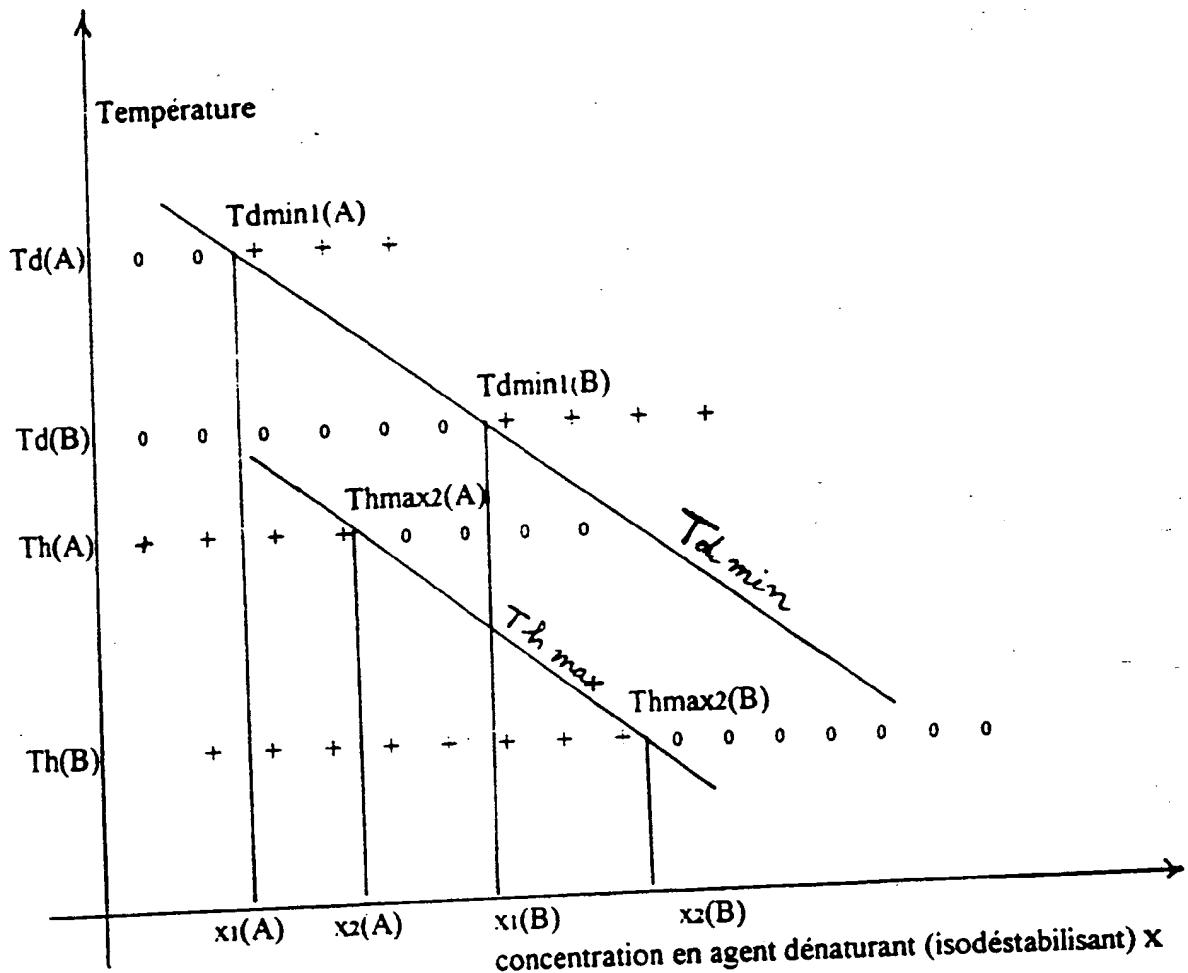
26°) Kit d'amplification d'au moins une séquence
25 cible d'acide nucléique, caractérisé en ce qu'il inclut un tampon selon l'une quelconque des revendications 1 à 14.

27°) Kit de détection d'au moins une séquence cible d'acide nucléique, caractérisé en ce qu'il inclut un tampon selon l'une quelconque des revendications 1 à 14.

1/10

FIGURE 1

2/10



$x_1(A)$ et $x_2(A)$: concentrations limites dans l'expérience PCR (A)

$x_1(B)$ et $x_2(B)$: concentrations limites dans l'expérience PCR (B)

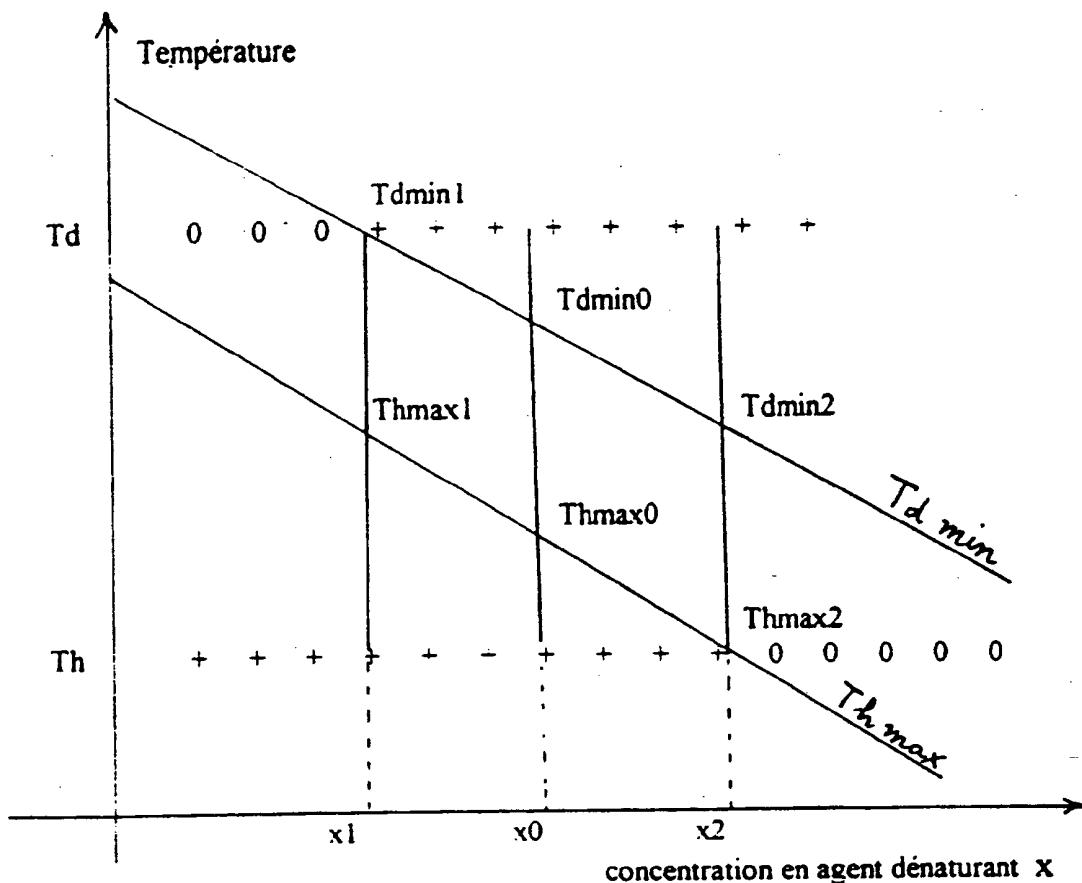
$T_d(A)$ et $T_h(A)$: températures maximales et minimales dans la PCR (A)

$T_d(B)$ et $T_h(B)$: températures maximales et minimales dans la PCR (B)

La droite $T_{d\min}$ relie les points de coordonnées $(x_1(A), T_d(A))$ et $(x_1(B), T_d(B))$

La droite $T_{h\max}$ relie les points de coordonnées $(x_2(A), T_h(A))$ et $(x_2(B), T_h(B))$

FIGURE 2



T_d : température maximale de la PCR; T_h : température minimale de la PCR.

Pour x_1 : l'hybridation des amorces est facile et la dénaturation des duplex est à la limite du possible.

Pour x_2 : l'hybridation des amorces est à la limite du possible et la dénaturation des duplex est facile.

Pour x_0 : l'hybridation des amorces et la dénaturation des duplex sont faciles.

FIGURE 3

4 / 10

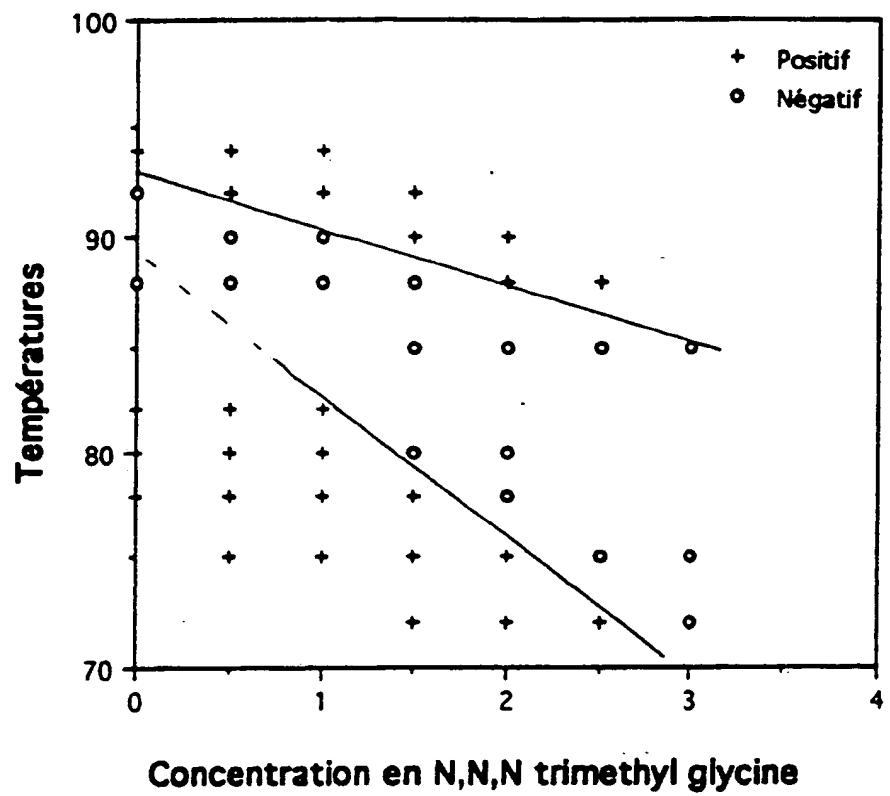


FIGURE 4

5 / 10

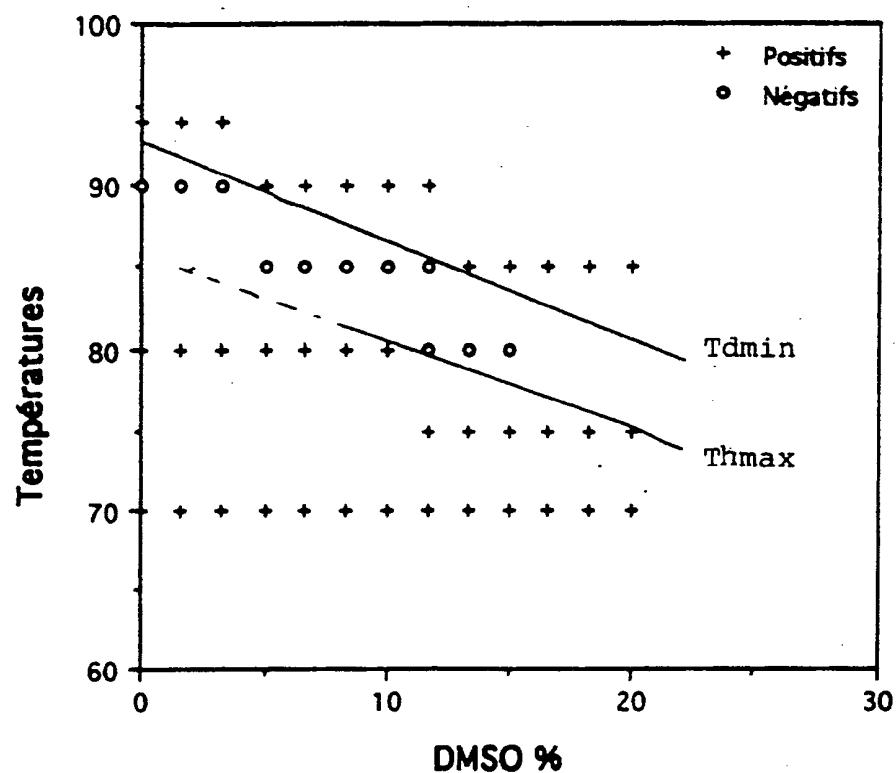


FIGURE 5

6/10

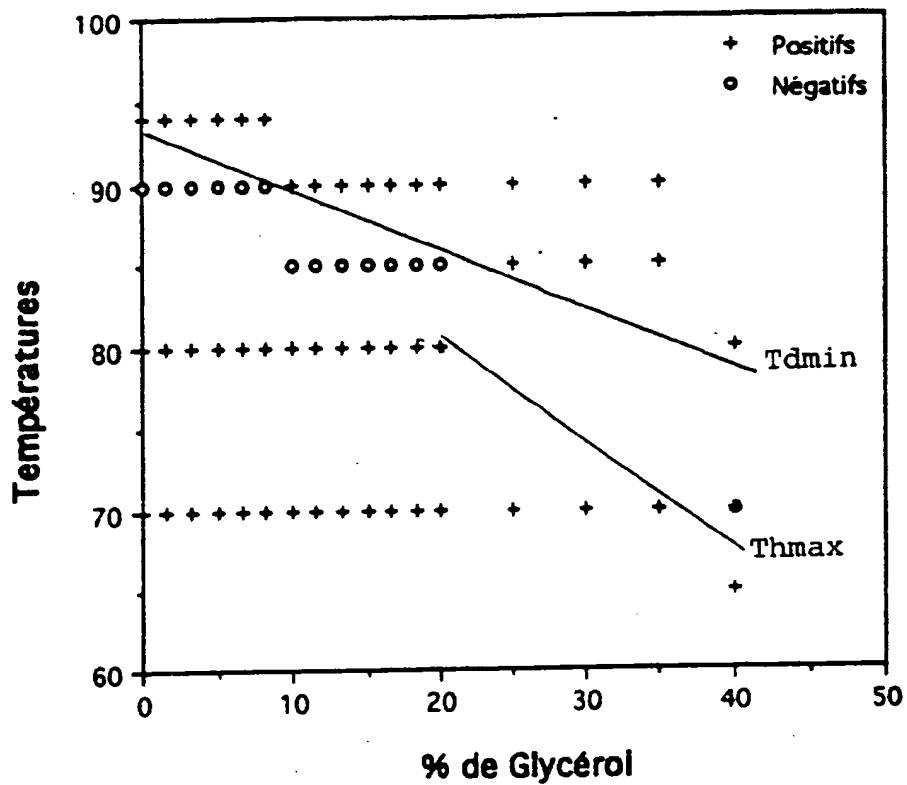


FIGURE 6

7/10

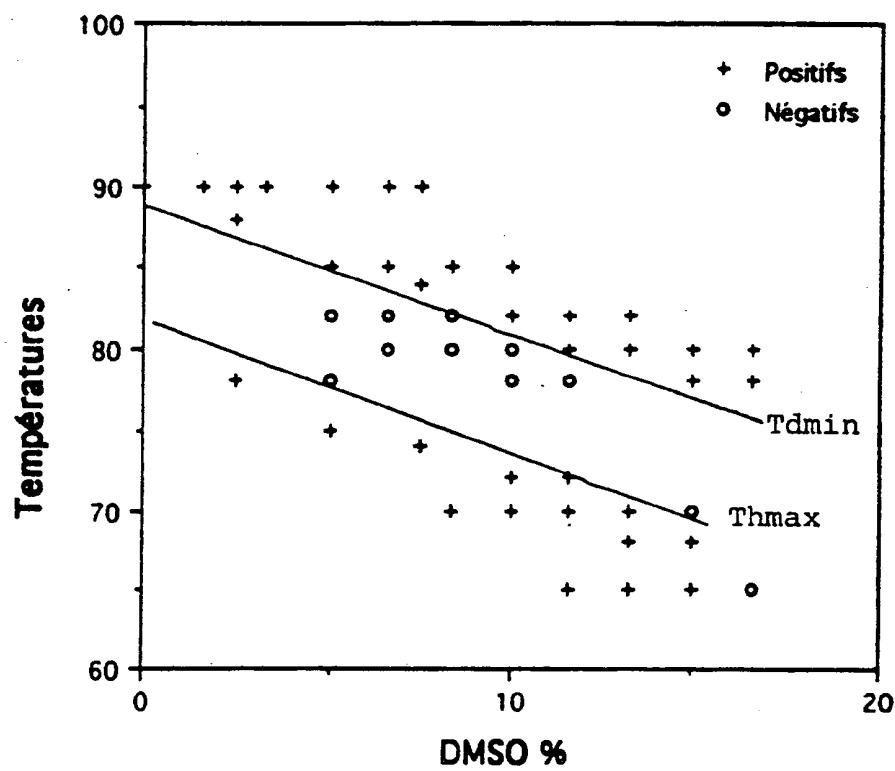


FIGURE 7

8 / 10

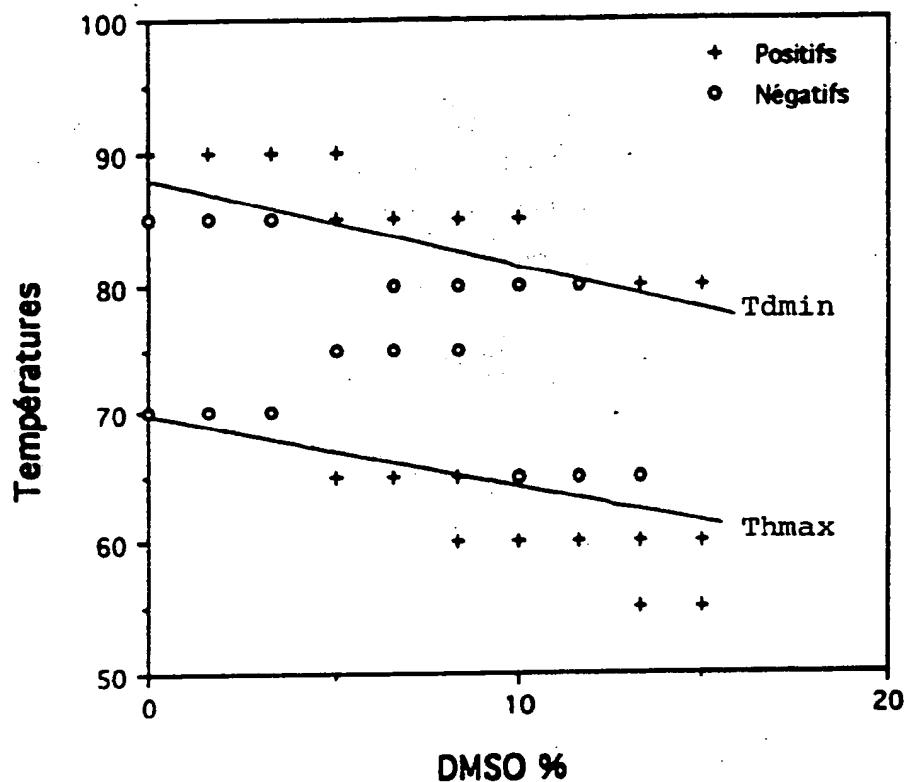


FIGURE 8

2733515

9/10

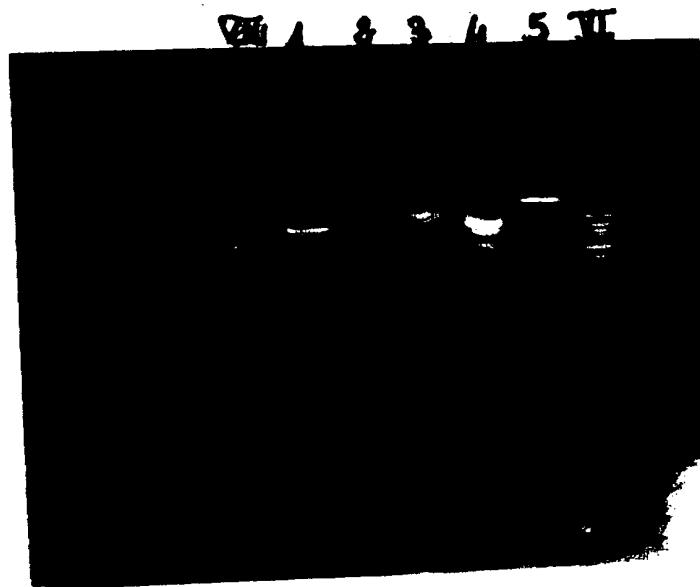


FIGURE 9

2733515

10/10

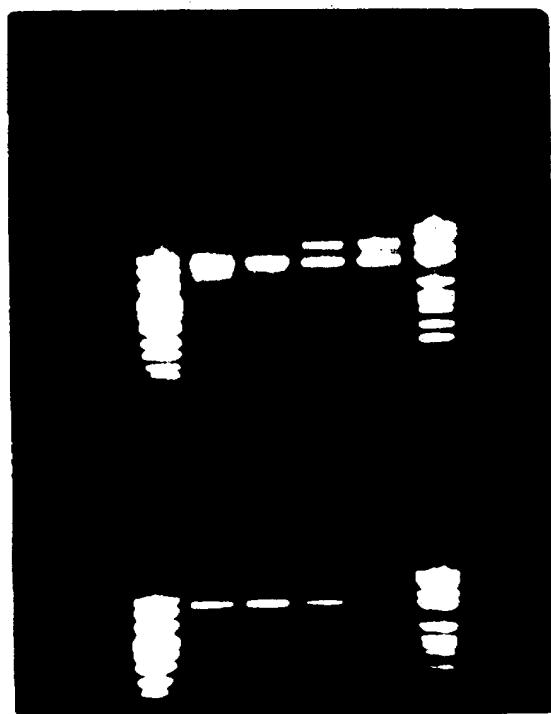


FIGURE 10

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
nationalFA 514222
FR 9505053

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
Y	BIOCHEMISTRY, vol. 32, no. 1, 12 Janvier 1993 EASTON, PA US, pages 137-144, W.A. REES ET AL. 'BETAINE CAN ELIMINATE THE BASE PAIR COMPOSITION DEPENDENCE OF DNA MELTING' * le document en entier * ---	1-4
D, Y	ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, vol. 209, no. 2, 1 Mars 1993 pages 284-290, XP 000349766 N. CHESTER ET AL. 'DIMETHYL SULFOXIDE-MEDIATED PRIMER TM REDUCTION: A METHOD FOR ANALYZING THE ROLE OF RENATURATION TEMPERATURE IN THE POLYMERASE CHAIN REACTION' * le document en entier *	1-4
A	---	5, 12, 15-17, 20, 21, 26, 27
A	J.M. GRAHAM & D. BILLINGTON (EDS.) 'PCR' 1994, BIOS SCIENTIFIC PUBLISHERS LTD., OXFORD GB * page 20 - page 23 * * page 113 - page 114 * ---	1-5, 12, 15-17, 20, 22-25
A	BIOCHEMISTRY, vol. 33, no. 40, 11 Octobre 1994 EASTON, PA US, pages 12255-12259, M. THAKAR ET AL. 'OSMOLYTE MEDIATION OF T7 DNA POLYMERASE AND PLASMID DNA STABILITY' * le document en entier * ---	1 -/-
Date d'achèvement de la recherche		Examinateur
21 Décembre 1995		De Kok, A
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non écrite P : document intercalaire		
T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		

INSTITUT NATIONAL

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIREN° d'enregistrement
nationalde la
PROPRIETE INDUSTRIELLEétabli sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la rechercheFA 514222
FR 9505053

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
D,A	GENE, vol. 140, 1994 AMSTERDAM NL, pages 1-5, K. VARADARAJ ET AL. 'DENATURANTS OR COSOLVENTS IMPROVE THE SPECIFICITY OF PCR AMPLIFICATION OF G+C-RICH DNA USING GENETICALLY ENGINEERED DNA POLYMERASES' * le document en entier * ---	1,2, 5-12,15, 16,22-27
D,A	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 91, Juin 1994 WASHINGTON US, pages 5695-5699, S. CHENG ET AL. 'EFFECTIVE AMPLIFICATION OF LONG TARGETS FROM CLONED INSERTS AND HUMAN GENOMIC DNA' * page 5697, colonne 1, alinéa 2 - colonne 2, alinéa 2 * ---	1,9-11
E	WO-A-95 20682 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 3 Août 1995 * page 2, ligne 7 - ligne 8 * * page 6, ligne 32 - ligne 33 * * page 8, ligne 13 - page 10, ligne 29 * * page 16, ligne 32 - page 17, ligne 27 * * page 25, ligne 20 - page 26, ligne 16 * ---	1,3,4, 12,13, 15-19, 22,26,27
E	DE-C-44 11 588 (DEUTSCHES RHEUMA FORSCHUNGSZENTRUM) 28 Septembre 1995 * le document en entier * ----	1,3,4
Date d'achèvement de la recherche		Examinateur
21 Décembre 1995		De Kok, A
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non écrite P : document intercalaire		
T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)